

KONZENTRATIONEN VON OCYTOCIN-, ÖSTROGEN- UND
GESTAGENREZEPTOREN WÄHREND DES ZYKLUS
IM BOVINEN ENDOMETRIUM

THOMAS MITTERMEIER

Disbui. München

1987

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
- Technische Universität München -
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg

vorgelegt über das Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Konzentrationen von Ocytocin-, Östrogen- und
Gestagenrezeptoren während des Zyklus
im bovinen Endometrium

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Thomas Mittermeier
aus
Landshut

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

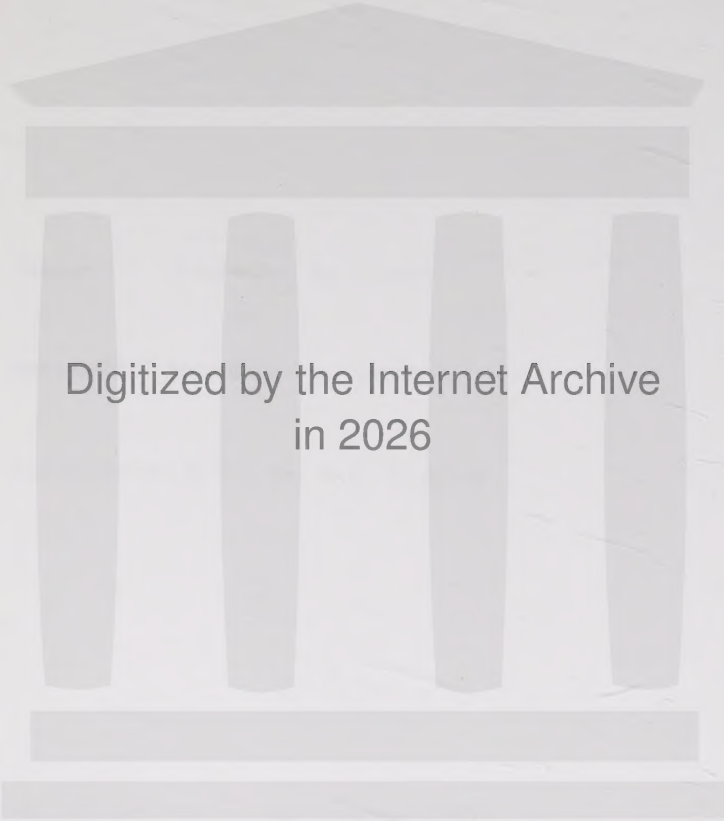
Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Liebich

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

<u>E i n f ü h r u n g</u>	1
----------------------------	---

<u>L i t e r a t u r ü b e r s i c h t</u>	2
--	---

A Oxytocinrezeptor	2
--------------------	---

1. Allgemeines	2
2. Biochemische Charakterisierung und Methodik	5
3. Physiologische Bedeutung und Modulation des Oxytocinrezeptors in Myometrium und Milchdrüse	7
4. Oxytocinrezeptoren im Endometrium beim Schaf und deren mögliche Bedeutung bei der Zyklus- regulation	10

B Östrogen- und Gestagenrezeptoren	12
------------------------------------	----

1. Allgemeines	12
2. Regulation und Modulation der Rezeptor- konzentrationen für Östrogene und Gestagene	14
3. Verlauf der Rezeptorkonzentrationen im Zyklus	15

<u>M a t e r i a l u n d M e t h o d e n</u>	18
--	----

A Material	18
------------	----

1. Tiere, Zyklusbeobachtung und -bestimmung	18
---	----

a) Proben von Schlachttieren mit unbekannter Anamnese	18
b) Proben von Kalbinnen mit definiertem Zyklusstand	20
c) Endometriumproben nach Ocytocindauerinfusion	21
d) Proben von anderen Geweben und Tierarten	21
2. Probengewinnung	22
3. Lagerung und Haltbarkeit der Proben	23
4. Substanzen und Geräte	25
B Rezeptorbestimmungen	27
1. Aufbereitung der Homogenate	27
2. Bestimmung des Ocytocinrezeptors	29
a) Prinzip	29
b) Routinebestimmung	30
c) Auswertung	31
d) Validierung	35
3. Bestimmung des cytosolischen Östrogenrezeptors	39
a) Prinzip	39
b) Routinebestimmung	39
c) Auswertung	40
d) Validierung	41

	SEITE
4. Bestimmung des Östrogenkernrezeptors	48
a) Prinzip	48
b) Routinebestimmung	48
c) Auswertung	50
d) Validierung	51
5. Bestimmung des cytosolischen Gestagenrezeptors	54
a) Prinzip	54
b) Routinebestimmung	54
c) Auswertung	55
d) Validierung	55
C Bezugsgrößen	62
1. Proteinbestimmungen	62
a) Biuret-Methode	62
b) Bromphenolblau-Methode	63
2. DNA - Bestimmung	65
3. Naßgewicht	68
D Bestimmungen von Ocytocin, LH und Progesteron	68

	SEITE
<u>E r g e b n i s s e</u>	70
A Ocytocinrezeptor	70
1. Konzentrationsverlauf im Zyklus	70
2. Einfluß einer Ocytocindauerinfusion	73
3. Bestimmung in Eileiter und Ovar des Rindes und im Endometrium des Schweines	75
B Östrogenrezeptor	76
C Gestagenrezeptor	79
D Vergleich der Bezugsgrößen	81
E Zusammenfassende Darstellung	84

	SEITE
<u>D i s k u s s i o n</u>	86
A Methodik	86
B Physiologie	90
<u>Z u s a m m e n f a s s u n g</u>	96
<u>S u m m a r y</u>	98
<u>T a b e l l e n a n h a n g</u>	100
<u>A b k ü r z u n g s v e r z e i c h n i s</u>	109
<u>L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s</u>	111



E i n f ü h r u n g

Die Rolle des Ocytocins und seines Rezeptors in der Uterusmuskulatur bei der Geburt und in den Myoepithelzellen der Milchdrüse bei der Milchejektion ist gut untersucht und zumindest grundsätzlich weitgehend geklärt. Unklar dagegen ist, welche Bedeutung dem Ocytocin und dem Ocytocinrezeptor bei der Regulation des Zyklusgeschehens zukommen könnte.

Einen solchen Zusammenhang legte, zumindest für die Wiederkäuer, der Nachweis von Ocytocinrezeptoren im Endometrium des Schafes nahe. Von verschiedenen Untersuchern konnte die Wirkung von Ocytocin auf Zykluslänge, Prostaglandinsynthese und Luteolyse in Abhängigkeit von den Rezeptorkonzentrationen des Ocytocins, der Östrogene und Gestagene und vom Zyklusstand beim Schaf gezeigt werden.

Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung war es nun, die Verlaufsmuster der Rezeptorkonzentrationen des Ocytocins, der Östrogene und Gestagene auch im bovinen Endometrium zu bestimmen und damit zur Klärung der Frage nach der Modulation des Ocytocinrezeptors durch Ovarsteroidoide und der Rolle des Ocytocins bei der Zyklusregulation beim Rind einige Aspekte beizutragen.

L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

A Ocytocinrezeptor

1. Allgemeines

Die Pionierarbeiten bei den Untersuchungen des Ocytocinrezeptors, sowie zahlreiche Untersuchungen von biochemischen Eigenschaften bis hin zur physiologischen Bedeutung des Rezeptors bei Geburt und Milchejektion wurden von Soloff und Mitarbeitern geleistet.

Sie wiesen erstmals 1972 und 1973 die Fähigkeit überlebender Gewebstückchen aus Uterus und Milchdrüse der Ratte nach, ^3H -Ocytocin aus dem Medium anzureichern (SOLOFF, SWARTZ, SAFFRAN, 1972; SOLOFF, SWARTZ, MORRISON, SAFFRAN, 1973b). Diese Bindung konnte von nicht markiertem Ocytocin und einigen synthetischen Analogon des Ocytocins entsprechend ihrer biologischen Aktivität verdrängt werden. Nicht verdrängt wurde die Bindung allerdings durch Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$. Autoradiographische Studien an Geweben aus Rattenmilchdrüse und Eileiter ergaben eine Lokalisation der ^3H -Ocytocin-Bindung in den glatten Muskelzellen (SOLOFF, REES, SAR, STUMPF 1975c).

In der Folgezeit wurde dann rasch eine relativ einfache und gangbare Methode zum Nachweis des Rezeptors entwickelt und das Hauptaugenmerk den Untersuchungen biochemischer Eigenschaften des Rezeptors und vor allem seiner physiologischen Bedeutung in den verschiedenen Zielorganen des Ocytocins zugewandt.

In der folgenden Aufstellung wird eine Übersicht über Arbeiten zum Ocytocinrezeptor, geordnet nach Tierarten und Organen, gegeben:

Ratte-Ovar

SOLOFF 1975a;

Ratte-Eileiter

SOLOFF, REES, SAR, STUMPF 1975c; SOLOFF 1975a;

Ratte-Myometrium

SOLOFF, SWARTZ, MORRISON, SAFFRAN 1973b; SOLOFF, SWARTZ 1974a; SOLOFF 1975 b; CRANKSHAW, BRANDA, MATLIB, DANIEL 1978; SOLOFF, ALEXANDROVA, FERNSTROM 1979b; ALEXANDROVA, SOLOFF 1980a; ALEXANDROVA, SOLOFF 1980b; ALEXANDROVA, SOLOFF 1980c; BERCU, HYASHI, POTH, ALEXANDROVA, SOLOFF, DONAHOE 1980; SOLOFF, SWEET 1982b; FUCHS, PERIYASAMY, ALEXANDROVA, SOLOFF 1983; FUCHS, PERIYASAMY, SOLOFF 1983b; SOLOFF, M.S., FERNSTROM, PERIYASAMY, S. SOLOFF, BALDWIN, WIEDER 1983a; PLISKA, HEINIGER, MÜLLER-LHOTSKY, ECKBERG 1984;

Ratte-Milchdrüse

SOLOFF, SWARTZ, SAFFRAN 1972; SOLOFF, SWARTZ 1973a; SOLOFF, REES, SAR, STUMPF 1975c; SCHROEDER, CHAKRABORTY, SOLOFF 1977; PEARLMUTTER, SOLOFF 1979; SOLOFF, WIEDER 1983b;

Ratte-Fettgewebe

BONNE, COHEN 1975;

Mensch-Myometrium

SOLOFF, SWARTZ, STEINBERG 1974b; SAKAMOTO, DEN, YAMAMOTO, ARAI, KAWAI, OYAMA, YOSHIDA, TAKAGI 1979; DEN, SAKAMOTO, KIMURA, TAKAGI 1981; FUCHS, A.-R., F. FUCHS, SOLOFF 1985;

Mensch-Endometrium

FUCHS, A.-R., F. FUCHS, SOLOFF 1985;

Schwein-Myometrium

SOLOFF, SWARTZ 1974a;

Meerschweinchen-Myometrium

ALEXANDROVA, SOLOFF 1980d;

Kaninchen-Myometrium

NISSENSON, FLOURET, HECHTER 1978; NISSENSON, FLOURET, HECHTER 1980;

Kaninchen-Milchdrüse

MARKLE, WARR, BRANDA 1978; WARR, BRANDA 1983;

Hamster-Myometrium

LEAVITT 1985a;

Schaf-Myometrium

ROBERTS, McCracken, GAVAGAN, SOLOFF 1976; PLISKA, HEINIGER, MÜLLER-LHOTSKY, ECKBERG 1984; LEAVITT, OKULICZ, McCracken, SCHRAMM, ROBIDOUX 1985b; SHELDRIK, FLINT 1985;

Schaf-Endometrium

ROBERTS, McCracken, GAVAGAN, SOLOFF 1976; McCracken 1980; McCracken, SCHRAMM, OKULICZ 1984; FLINT, SHELDRIK 1985; LEAVITT, OKULICZ, McCracken, SCHRAMM, ROBIDOUX 1985b; SHELDRIK, FLINT 1985;

Rind-Endometrium

SCHAMS, KOLL, IVELL, MITTERMEIER, KRUIP 1986;

Übersichtsarbeiten

SOLOFF 1976; SOLOFF, SCHROEDER, CHAKRABORTY, PEARLMUTTER 1977; SOLOFF 1979a; SOLOFF, PEARLMUTTER 1979c; SOLOFF 1982a;

Liganden

THOMPSON, FREYCHET, ROTH 1972; FLOURET, TERADA, YANG, NAKAGAWA, NAKAHARA, HECHTER 1977; SMITH, CHAN, WALTER 1977; WALTER 1977;

2. Biochemische Charakterisierung und Methodik

Zum Nachweis des Rezeptors wurden die Gewebeproben homogenisiert und die Suspensionen der Homogenate mit sehr unterschiedlichen g_{av} -Zahlen zentrifugiert. Die jeweiligen pelletförmigen Sedimente dienten dem Rezeptornachweis, wobei sich aber kein nennenswerter Unterschied in der Bindungskapazität der verschiedenen Pellets ergab (SOLOFF et al. 1973a und 1974a). Die Bindungsstudien erfolgten durch Scatchard-Analyse (SCATCHARD 1949), wobei entweder die Proben mit gleichbleibenden Konzentrationen an markiertem Ocytocin und verschiedenen Konzentrationen an nicht markiertem Ocytocin (SOLOFF et al. 1973a und 1974a; FUCHS et al. 1985; FLINT et al. 1985; LEAVITT et al. 1985b) oder mit verschiedenen Konzentrationen an 3H -Ocytocin und jeweils einem Überschuß an kaltem Ocytocin (NISSENSON et al. 1978 und 1980) inkubiert wurden.

Die Inkubation wurde bei 20° C für 40 - 90 Minuten bei einem pH von 7.6 durchgeführt (SOLOFF et al. 1973 und 1974; MARKLE et al. 1978). Einige Autoren fanden bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten und einer Temperatur von 25° C (SHELDRIK et al. 1985) bzw. von 30° C (NISSENSON et al. 1978) optimale Bindungskapazität. Die Inkubation wurde entweder durch Zentrifugation (SOLOFF et al. 1973a; SOLOFF et al. 1974a und b; MARKLE et al. 1978; CRANKSHAW et al. 1978; SAKAMOTO et al. 1979; DEN et al. 1981) oder durch Vakuumfiltration über Zelluloseazetat-Membranfilter mit einer Porengröße von 0.2 μm (NISSENSON et al. 1978; PEARLMUTTER et al. 1979; NISSENSON et al. 1980; ALEXANDROVA et al. 1980a) beendet. Letzteres ist die jetzt übliche Methode.

Die biochemische Struktur des Ocytocinrezeptors ist noch nicht aufgeklärt. Allem Anschein nach handelt es sich aber um ein in der Zellmembran lokalisiertes Protein. Trypsin und einige andere proteolytische Fermente senken die Bindung des

Ocytocins an den Rezeptor irreversibel (SOLOFF et al. 1973a und 1974a). Die Rezeptorsynthese kann auch in vitro durch die Proteinsynthese hemmende Substanzen wie Cycloheximid (SOLOFF et al. 1983a) oder Actinomycin D (NISSENSON et al. 1978) gehemmt werden. Durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation und die parallele Bestimmung von sog. Markerenzymen in den einzelnen Fraktionen konnte gezeigt werden, daß der Ocytocinrezeptor in der Zellmembran lokalisiert ist. Die Aktivität von 5'-Nukleotidase verlief in den einzelnen Fraktionen parallel zur spezifischen Bindungskapazität für Ocytocin (CRANKSHAW et al. 1978), und auch das Verhältnis der molaren Konzentrationen von Cholesterin und Phospholipiden war in dieser Fraktion für die Zellmembran typisch (MARKLE et al. 1978). Inwieweit Phospholipide bei der Hormon-Rezeptor-Bindung eine Rolle spielen, oder gar Bestandteil des Rezeptors sind, ist unklar. Während SOLOFF et al. 1973a keinen Einfluß von Phospholipasen auf die Ocytocin-Bindung feststellen konnten, fanden WARR et al. 1983, daß Phospholipase C die Bindung von Ocytocin an den Rezeptor aufhebt.

Die Bindung des Ocytocins an den Rezeptor ist nur in Gegenwart eines zweiwertigen Metallions möglich. Die Zugabe von Co^{++} und Mn^{++} erbringt die größte Rezeptorausbeute, aber auch Mg^{++} und Zn^{++} haben einen positiven Einfluß auf die Hormon-Rezeptor-Bindung. Ca^{++} hat, wie auch einwertige Kationen wie Li^+ , Na^+ oder K^+ , keinen Einfluß auf die Bindung (SOLOFF et al. 1973a; PEARLMUTTER et al. 1979). Daraus erklärt sich auch, daß nach Zugabe von EDTA in ausreichender Menge die Bindung des Ocytocins an den Rezeptor reversibel aufgehoben wird.

Ein möglicher Wirkungsmechanismus des Ocytocins könnte sich aus dem Befund ergeben, daß Ocytocin in seinen Zielorganen eine Ca^{++} - Mg^{++} -ATPase-Aktivität zu hemmen vermag. Diese Hemmung wird auch mit Ocytocinanalogen entsprechend ihrer biologischen Aktivität erreicht.

Kinetische Studien und die Unterdrückbarkeit dieses Phänomens mit Progesteron lassen vermuten, daß diese Wirkung mit der Bindung des Ocytocins an den Rezeptor gekoppelt ist (SOLOFF et al. 1982b).

3. Physiologische Bedeutung und Modulation des Ocytocinrezeptors im Myometrium und in der Milchdrüse

Die klassischen Zielorgane des Ocytocins sind die Milchdrüse und der Uterus. Die Rezeptoren werden in der glatten Muskulatur dieser Organe gefunden und vermitteln dort die Funktion des Ocytocins bei der Regulation der Milchejektion und der Uteruskontraktionen bei Brunst und Geburt. Aber auch im Fettgewebe der Ratte konnten Ocytocinrezeptoren nachgewiesen werden. Ocytocin zeigte an isolierten Fettzellen eine insulinähnliche Wirkung (BONNE et al. 1975). Keine Ocytocinrezeptoren wurden in Rattenovarien gefunden (SOLOFF 1975a). Schließlich wird eine weitere physiologische Bedeutung diskutiert, seit im Endometrium des Schafes und auch des Menschen Ocytocinrezeptoren gefunden wurden und deren Potenz, Prostaglandinsekretion auszulösen, nachgewiesen werden konnte. Auf letzteres wird im nächsten Abschnitt noch genauer eingegangen.

In der Milchdrüse, die nur bei Ratte (SOLOFF et al. 1972; SOLOFF et al. 1973a; SOLOFF et al. 1975c; SCHROEDER et al. 1977; PEARLMUTTER et al. 1979; SOLOFF et al. 1983b) und Kaninchen (MARKLE et al. 1978; WARR et al. 1983) bislang genauer untersucht wurde, kommen die Ocytocinrezeptoren in den Myoepithelzellen vor (SOLOFF et al. 1975c; SCHROEDER et al. 1977; SOLOFF et al. 1983b). Bezogen auf die ganze Milchdrüse, nimmt die Konzentration des Ocytocinrezeptors während der Trächtigkeit langsam, während der Laktation sehr stark zu und fällt schließlich in der Involutionsphase wieder auf Basiswerte ab. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn die Rezep-

torkonzentration auf die Konzentration des Membranproteins in der Rezeptorfraktion bezogen wird. Dabei steigt die Rezeptorkonzentration in der Trächtigkeit an, bleibt während der Laktation auf etwa gleichem Niveau, erreicht aber dann mit Beginn der Involution das 10fache der Konzentration während der Laktation (SOLOFF et al. 1983b). Die Basiswerte werden erst am Ende der Involutionsphase erreicht. Dies dürfte auf eine schnellere Regression der sekretorischen Zellen im Vergleich zu den Myoepithelzellen zurückzuführen sein (RADNOR 1972). Die Rezeptorkonzentration in der Milchdrüse scheint daher von der Zahl der Myoepithelzellen und vom Funktionszustand des Organs abhängig zu sein. Ob die Konzentration des Ocytocinrezeptors in der Milchdrüse zusätzlich einer Modulation durch andere Hormone unterworfen ist, ist bisher nicht bekannt und auch noch nicht weiter untersucht.

In zahlreichen Arbeiten wurde die physiologische Bedeutung des Ocytocinrezeptors im Myometrium, hauptsächlich bei der Ratte, aber auch bei Mensch, Meerschweinchen, Schwein, Kaninchen und Schaf, untersucht. Die Untersuchungen konzentrierten sich vor allem auf die Rolle des Rezeptors bei der Geburt und während der Trächtigkeit, aber auch der Verlauf im Brunstzyklus wurde bestimmt. Im Zyklus ist bei Ratte und Schaf die Rezeptorkonzentration im Proöstrus und Östrus am höchsten und fällt nach der Brunst auf ein Niveau unterhalb des Meßbereiches ab (ROBERTS et al. 1976; SOLOFF 1979a). Beim Menschen scheint im Zyklus die Rezeptorkonzentration in der Lutealphase am höchsten zu sein, während sie in der Follikelphase sehr niedrig ist (FUCHS et al. 1985). Während der gesamten Trächtigkeit bleibt bei der Ratte die Konzentration des Ocytocinrezeptors auf einem sehr niedrigen Niveau, steigt einige Stunden vor der Geburt an und erreicht ein Maximum während der Wehen. Diesem Anstieg geht der Abfall der Plasmaprogesteron-Konzentration und ein Anstieg der Konzentration des Östrogenrezeptors, des cytosolischen wie des Kernrezeptors voraus (ALEXANDROVA et al. 1980a). Dies verhält sich

gleichermaßen, wenn die Geburt durch Gabe von Prostaglandinen ausgelöst wird (ALEXANDROVA et al. 1980c). Die Konzentration des Ocytocinrezeptors im Uterus scheint auch nicht vom Füllungsgrad des Uterus bestimmt zu werden (ALEXANDROVA et al. 1980b), sondern unterliegt der Modulation durch Gestagene und Östrogene und deren Rezeptorkonzentrationen. In vivo- und in vitro-Versuche an intakten und an ovariectomierten Ratten haben nach Applikation von Progesteron, Östrogenen oder Kombinationen daraus, ergeben, daß Progesteron die Ocytocinrezeptorkonzentration senkt bzw. die Rezeptorsynthese hemmt, und Östrogene die Synthese fördern, wobei die Wirkung des Progesterons über die Östrogenwirkung dominiert (SOLOFF 1975a und b; ALEXANDROVA et al. 1980c; FUCHS et al. 1983a und b; SOLOFF et al. 1983a). Dies konnte auch für das Kaninchen (NISSENSON et al. 1978 und 1980) und für das Schaf, worauf später noch genauer eingegangen wird, gezeigt werden. Die gemessenen Rezeptorkonzentrationen und Dissoziationskonstanten ließen sich dabei gut mit der Ansprechbarkeit des Uterus auf Ocytocin in Einklang bringen (NISSENSON et al. 1980; FUCHS et al. 1983b).

Bei Mensch und Meerschweinchen, wie zum Teil bereits beschrieben, verlaufen die Ocytocinrezeptorkonzentrationen anders und scheinen nicht in gleicher Weise von Progesteron und Östrogenen reguliert zu werden. Bei diesen Spezies steigt die Rezeptorkonzentration im Myometrium während der Gravidität kontinuierlich an und erreicht bereits einige Zeit vor der Geburt ihr Maximum, auf dem sie dann bis zur Geburt verweilt. Auch kommt es vor der Geburt nicht zu dem bei den anderen Spezies zu beobachtenden Abfall des Plasmaprogesteronspiegels (SAKAMOTO et al. 1979; ALEXANDROVA et al. 1980d; DEN et al. 1981). In welcher Weise der Ocytocinrezeptor bei Mensch und Meerschweinchen reguliert wird und wodurch schließlich die Geburt ausgelöst wird, ist noch nicht geklärt.

4. Ocytocinrezeptoren im Endometrium beim Schaf und deren mögliche Bedeutung bei der Zyklusregulation

Von mehreren Autoren wurden auch im Endometrium des Schafes die Konzentrationen des Ocytocinrezeptors bestimmt und einige Hinweise für deren Rolle bei der Zyklusregulation gefunden. Da diese Ergebnisse Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren, seien sie im Folgenden etwas genauer dargestellt.

Im Endometrium des Schafes ist die Ocytocinrezeptorkonzentration etwa doppelt so hoch wie im Myometrium. Die Konzentration ist zyklusabhängig, steigt kurz vor dem Östrus an, erreicht am Tag der Brunst die höchsten Werte, die um 800 - 1000 fmol/mg Protein liegen und fällt nach der Brunst innerhalb weniger Tage wieder ab. Ocytocin wird mit hoher Affinität an den Rezeptor gebunden, die Dissoziationskonstante bewegt sich im Bereich von 0.6 - 0.7 nM. Bei in vitro-Versuchen mit überlebendem Endometrium konnte gezeigt werden, daß Ocytocin in Abhängigkeit von der Ocytocindosis einerseits und in Abhängigkeit vom Zyklusstand, und damit der Ocytocinrezeptorkonzentration andererseits, in der Lage ist, die Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Sekretion zu verstärken (ROBERTS et al. 1976). Dieser Effekt konnte auch in vivo nachvollzogen werden.

Entweder nach mechanischer Stimulierung des Uterus oder nach Ocytocingabe in die Uterusarterie konnte am Tag 13 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Sekretion ausgelöst werden. Am Tag 8 des Zyklus war dies nicht möglich (ROBERTS, BARCIKOWSKI, WILSON, SKANES, McCracken 1975). Im Endometrium des Schafes beeinflussen Progesteron und Östrogene die Bildung des Ocytocinrezeptors. Bei einer Progesterondauerinfusion über 10 Tage bei ovariectomierten Schafen konnte zunächst eine zusätzliche Östradiol-17 β -Infusion für 12 Stunden die Bildung von Ocytocinrezeptoren nicht hervorrufen. Nach 10 Tagen war

der Progesteronblock trotz fortgesetzter Progesteroninfusion aufgehoben, nach 12-stündiger Östradiol-Infusion war das Endometrium wieder sensitiv für Ocytocin und sezernierte PGF_{2α} (McCRACKEN 1980). Dies führte zu der Hypothese, daß bei lang anhaltendem hohen Progesteronspiegel sich die Progesteronrezeptoren erschöpfen und das Endometrium refraktär für die Progesteronwirkung wird. Die dann wieder mögliche Synthese des Östrogenrezeptors ermöglicht schließlich die Bildung von Ocytocinrezeptoren, Prostaglandinsekretion und Luteolyse (McCRACKEN 1980; McCRACKEN et al. 1984).

Ein weiterer Hinweis auf die Rolle des Ocytocinrezeptors bei der Luteolyse folgt aus dem Umstand, daß bei Ocytocindauerinfusion, die vor der Luteolyse begonnen wurde, eine Zyklusverlängerung möglich ist. Dies wird mit einer Downregulation der Ocytocinrezeptoren durch die Infusion erklärt. Etwas im Widerspruch dazu steht aber der Befund, daß nach Cloprostenol-Gabe, ungeachtet der fortdauernden Ocytocininfusion die Luteolyse eintritt und die Konzentration des Ocytocinrezeptors auf östrustypische Werte ansteigt (FLINT et al. 1985).

Die Blockierung der Rezeptorsynthese zeigt sich auch in einem Versuch, in dem nach 5 Tagen paralleler Infusion von Progesteron und Östradiol die Infusion von Progesteron beendet wurde und 0, 3, 6 und 12 Stunden danach in Endo- und Myometrium die verschiedenen Rezeptorkonzentrationen bestimmt wurden. Im Endometrium stiegen danach die Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors und des Östrogenkernrezeptors, des Ocytocinrezeptors und des cytosolischen Gestagenrezeptors deutlich an, im Myometrium war nur ein Anstieg des Ocytocinrezeptors und des Östrogenrezeptors zu beobachten (LEAVITT et al. 1985b).

B Östrogen- und Gestagenrezeptoren

1. Allgemeines

Die Wirkung der Östrogene wird durch intrazelluläre Proteine, die diese Hormone spezifisch binden, vermittelt. TOFT und GORSKI gelang es 1966 als Erste den Östrogenrezeptor im Cytosol nachzuweisen. Nachstehend sind einige Aspekte der Wirkungsweise des Östrogenrezeptors erläutert. Ähnliche Wirkungsmechanismen sind aber auch für die Rezeptoren anderer Steroide anzunehmen.

Diese Rezeptoren binden die Steroide nicht kovalent, aber relativ fest mit einer Dissoziationskonstanten in der Größenordnung von 10^{-9} M (JUNGBLUT, GAUES, GÖRLICH, HUGHES, KALLWEIT, KIELHORN, LITTLE, MASCHLER, McCANN, PARL, ROSENFELD, SIERRALTA, STONE, SZENDRO, TERAN, TRUITT, WAGNER 1980). Sie kommen in drei subzellulären Fraktionen vor: Gebunden an Mikrosomen, im Cytosol gelöst und gebunden an das Chromatin des Kerns (LITTLE, ROSENFELD, JUNGBLUT 1972; LITTLE, SZENDRO, TERAN, HUGHES, JUNGBLUT 1975; JUNGBLUT, HEKIM, MEYER, SIERRALTA, SZENDRO 1983). Die mikrosomale Fraktion scheint eine Vorstufe des Rezeptors zu sein, die aus einer Rezeptorneusynthese hervorgegangen ist. Sie weist die gleiche Potenz auf, Hormon zu binden, scheint die gleiche Tendenz zur Dimerisation nach Bindung des Hormons zu haben, wird aber nie im Kern vorgefunden.

Bei der Behandlung des cytosolischen oder des Östrogenkernrezeptors mit Hyaluronidase oder Eliminase entstand wieder mikrosomaler Rezeptor. Genauere Untersuchungen der beiden Bruchstücke legten ein Modell nahe, nach dem zur Fertigstellung des mikrosomalen Rezeptors, der als "Core-Protein" bezeichnet wird, noch ein weiterer Proteinanteil hinzugefügt wird. Dieser Anteil ist für die Bindung des Rezeptors an das

Chromatin des Kerns notwendig, beeinflusst aber nicht die Hormon-Rezeptor-Bindung und kann auch selbst nicht Hormon binden.

Der cytosolische Rezeptor ist mit dem Kernrezeptor identisch, dimerisiert nach Bindung mit dem Hormon und wird als Hormon-Rezeptor-Komplex im Kern zurückgehalten (JUNGBLUT et al. 1983). Der molekulare Mechanismus der Steroidhormonwirkung ist noch nicht geklärt, bisher existieren Hinweise für folgende Vorgänge: Das Steroidhormon, das die Zellmembran ungehindert passieren kann, bindet an den im Cytosol gelösten Rezeptor. Dieser dimerisiert und wandert als Dimer in den Kern, wird dort an das Chromatin gebunden und entfaltet danach die für das Hormon spezifische Wirkung (JUNGBLUT, GAUES, HUGHES, KALLWEIT, SIERRALTA, SZENDRO, WAGNER 1976). Für die Migration des Rezeptors in den Kern, in den er sowohl als Monomer als auch als freier Rezeptor gelangt (JUNGBLUT, KALLWEIT, SIERRALTA, TRUITT, WAGNER 1978a), scheinen Diffusionsvorgänge verantwortlich zu sein (JUNGBLUT et al. 1983). Das an den Rezeptor gebundene Steroidhormon moduliert dabei den Umfang der Retention des Rezeptors im Kern, wobei zum Beispiel die verschiedenen Östrogene entsprechend ihrer Wirksamkeit die Retention des Hormon-Rezeptor-Komplexes unterschiedlich zu beeinflussen vermögen (LITTLE et al. 1975; JUNGBLUT, HUGHES, GAUES, KALLWEIT, MASCHLER, PARL, SIERRALTA, SZENDRO, WAGNER 1979). Ein einmal an das Chromatin gebundener Rezeptor wird anschließend abgebaut. Steigen die Konzentrationen des cytosolischen Rezeptors nach einer einmaligen Östrogengabe wieder an, so ist dies einer Rezeptorneusynthese zuzuschreiben und nicht der Wiederverwendung des Kernrezeptors (JUNGBLUT et al. 1976; SIERRALTA, SZENDRO, KALLWEIT, JUNGBLUT 1985). In geringem Umfang wird Rezeptor, auch ohne mit Hormon besetzt zu sein, an den Kern gebunden (JUNGBLUT et al. 1976 und 1978a; JUNGBLUT, KALLWEIT, SIERRALTA, TRUITT, WAGNER 1978). Dies könnte eine basale,

von der Gegenwart des Hormons unabhängige Wirkung erklären (JUNGBLUT et al. 1978b).

2. Regulation und Modulation der Rezeptorkonzentrationen für Östrogene und Gestagene

Die Wirkung der Östrogene auf zellulärer Ebene besteht in einer allgemeinen Stimulierung des Zellstoffwechsels. Dies zeigt sich unter anderem in morphologischen Veränderungen wie Zellvergrößerung und Zellteilung, Zunahme des endoplasmatischen Reticulums und der Ribosomen, Vergrößerung des Kerns und a.m. (JUNGBLUT et al. 1979 und 1980). Mit dieser allgemeinen Stimulierung des Stoffwechsels geht auch eine verstärkte Proteinsynthese, und vor allem auch eine forcierte Synthese des Östrogenrezeptors, einher. Nach einer einmaligen Gabe von Östrogenen bei einem ovariectomierten Schwein folgt auf eine minutenschnelle Entleerung des Cytosols innerhalb der folgenden Stunden eine Wiederauffüllung mit Östrogenrezeptor. Zuerst steigt dabei die Konzentration des mikrosomalen Rezeptors, der wahrscheinlichen Vorstufe des Östrogenrezeptors, gefolgt von einem Anstieg der Konzentration des sog. fertigen Rezeptors (JUNGBLUT et al. 1979 und 1980). Von den Östrogenen wird allerdings nicht nur die Synthese des eigenen Rezeptors, sondern auch die des Progesteronrezeptors bestimmt (VU HAI, LOGEAT, WAREMBOURG, MILGROM 1977; LEAVITT et al. 1985b). Progesteron senkt die Konzentrationen sowohl des eigenen Rezeptors, als auch des Östrogenrezeptors (HSUEH, PECK, CLARK 1976; WALTERS, CLARK 1978; EVANS, CHEN, HENDRY III, LEAVITT 1980; REXROAD 1981; OKULICZ, MacDONALD, LEAVITT 1981; LEAVITT, MacDONALD, OKULICZ 1983; McCRACKEN, SCHRAMM, OKULICZ 1984; LEAVITT et al. 1985b). Der Mechanismus der Progesteronwirkung ist bislang ungeklärt. Einige Autoren postulieren einen von Progesteron induzierten Faktor, der die Wirkung des Östrogenkernrezeptors reguliert (EVANS et al. 1980;

OKULICZ et al. 1981; McCracken et. al 1984).

Die Wirkung des Progesterons auf die Rezeptorkonzentrationen wurde auch durch einen Versuch gezeigt, bei dem nach plötzlichem Absetzen einer Progesterondauerinfusion unter Aufrechterhaltung hoher Östrogenspiegel in kurzer Zeit die Rezeptorkonzentrationen für Östrogen, Ocytocin und auch für Progesteron wieder anstiegen (LEAVITT et al. 1985b).

3. Verlauf der Rezeptorkonzentrationen im Zyklus

Im Vergleich zu den zahllosen Untersuchungen, die sich mit den biochemischen Eigenschaften der Steroidrezeptoren oder deren Regulation durch die Steroide befassen, sind Bestimmungen des Rezeptorkonzentrationsverlaufs im unbeeinflussten Zyklus verhältnismäßig wenig durchgeführt worden. Nachstehend seien kurz Untersuchungen zusammengefaßt, die die Konzentrationen von Östrogen- und Gestagenrezeptor im Endometrium während des Zyklus bei Rind, Schwein und Schaf zum Gegenstand hatten.

Beim Schwein erreicht die Konzentration des Östrogenkernrezeptors ihr höchstes Niveau am Tag vor der Ovulation, fällt anschließend stark ab, bleibt bis zum Tag 9 auf sehr niedrigem Niveau, ist vom Tag 9 - 14 überhaupt nicht mehr festzustellen und steigt erst zur nächsten Brunst wieder an. Die Konzentrationen bewegen sich dabei von 1.3 pmol/mg DNA (Östrus) bis 0.3 pmol/mg DNA in den Tagen nach der Brunst. Dem Gipfel der Kernrezeptorkonzentration geht ein Anstieg der Konzentration des cytosolischen Rezeptors voraus. Am Tag 5 des Zyklus kommt es noch einmal zu einem Anstieg der Konzentration des cytosolischen Östrogenrezeptors, dem aber kein entsprechender Anstieg des Kernrezeptors folgt (Letzteres könnte auf einen Abbau des Östradiols durch die zu diesem Zeitpunkt hohe Aktivität der Östrogen-Sulfotransferase zurückzuführen sein.)(PACK, CHRISTENSEN, DOURAGHY, BROOKS 1978).

Andere Untersucher finden einen Anstieg des cytosolischen Östrogenrezeptors, beginnend kurz vor der Brunst, zu einem Maximum um den Tag 10 und einen Abfall der Konzentrationen bis zur Luteolyse (DEAVER, GUTHRIE 1980). D'ISTRIA und Mitarbeiter können während des Zyklus keine Veränderung im Gehalt an Östrogenkernrezeptor finden (D'ISTRIA, CITRARELLA, ENNE, GENAZZANI, PEROTTI, DELRIO 1980). Die Konzentration des cytosolischen Gestagenrezeptors hat ein Maximum am Tag der Brunst und fällt bis zum Ende des Zyklus ab (D'ISTRIA et al. 1980; KOZIOROWSKI, KOTWICA, STEFANCZYK, KRZYMOWSKI 1984).

Im Endometrium des Schafes ist die Konzentration des cytosolischen Östrogenrezeptors zum Zeitpunkt der Brunst am höchsten. Sie fällt auf minimale Werte bis zum Tag 14 des Zyklus ab. Der cytosolische Gestagenrezeptor hat sein Maximum an den Tagen 0 - 5, seine Konzentration fällt ebenfalls bis zu den Tagen 10 - 14 ab. Gleichermaßen verhalten sich die Proteinsyntheseaktivität und das RNA:DNA - Verhältnis im Endometrium (MILLER, MURPHY, STONE 1977). Der Verlauf des cytosolischen Östrogenrezeptors wird auch wie folgt beschrieben: An den Tagen 0, 3, 6 des Zyklus betrug die Konzentration des Östrogenkernrezeptors 1.21 ± 0.18 fmol/ μ g DNA, bis zum Tag 10 fiel die Konzentration auf 0,64 fmol/ μ g DNA ab (KOLIGIAN et al. 1977).

An den Tagen 18 - 20 und 0 - 4 sind beim Rind die Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors deutlich höher als in der Mittlutealphase. Unterschiede in einzelnen Bereichen des Uterus oder zwischen den beiden Hörnern konnten nicht gefunden werden (SENIOR 1975; HENRICKS, HARRIS 1978). Die Konzentration des cytosolischen Gestagenrezeptors wurde am Tag der Brunst und am Tag 12 bestimmt. Für den Tag der Brunst wird eine Konzentration von 1.2 pmol/mg DNA, für den Tag 12 0.6 pmol/mg DNA angegeben (ZELINSKI, NOEL, WEBER, STORMSHAK 1982). Die Konzentration des Progesteronkernrezeptors wurde an den Tagen 4, 10/11 und 18 des Zyklus bestimmt,

wobei sich kein klares Bild über den Verlauf der Rezeptorkonzentrationen ergab. Einheitlich hohe Konzentrationen wurden an den Tagen 10 und 11 gemessen. Das zum Corpus luteum ipsilaterale Horn wies dabei etwa doppelt so viele Bindungsstellen pro Zelle auf, wie das kontralaterale Uterushorn. Sehr variabel aber sind die Daten für die Tage 4 und 18 und für die Brunst, die in diesen Stadien zwischen nicht meßbaren und maximalen Werten schwanken (ATKINS, KRAEMER, HARMS, FLEEGER 1980).

M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

A Material

1. Tiere, Zyklusbeobachtung und -bestimmung

a) Proben von Schlachttieren mit unbekannter Anamnese

Eine Serie von 54 Endometriumproben, die von beliebigen Schlachtkühen, deren Zyklusstand und Anamnese vorher nicht bekannt war, am Schlachthof gewonnen wurden, diente zunächst der Etablierung und Standardisierung der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Konzentrationen von Rezeptoren, Protein und DNA. Zusätzlich ergab sich daraus eine erste Abschätzung des Konzentrationsverlaufs des Ocytocinrezeptors im Zyklus.

Die Bestimmung des Zyklusstandes mußte sich dabei einerseits auf die Progesteronkonzentration im Plasma, andererseits auf die Beurteilung der Funktionsgebilde an den Ovarien, auf den Öffnungsgrad der Cervix und auf Menge und Konsistenz des Schleimes in Cervix und Uteruslumen stützen. Die für die Progesteronbestimmung notwendigen Blutproben wurden beim Entbluten des Tieres entnommen.

Unter diesen Bedingungen läßt sich der Zyklusstand im Zeitraum der Brunst verhältnismäßig genau eingrenzen, eine Differenzierung in verschiedene Lutealstadien ist so aber sehr schwierig, was besonders für die zweite Hälfte der Lutealphase zutrifft. Ausgehend von einer Zyklusdauer von 21 Tagen, wobei der Tag der Ovulation als Tag 1 festgelegt war (SCHAMS, SCHALLENBERGER, HOFFMANN, KARG 1977), wurden die 54 Proben 5 verschiedenen Zyklusstadien zugeordnet. Die

Kriterien der Zuordnung zu den verschiedenen Gruppen und die Anzahl der Tiere in einer Gruppe sind im Folgenden erläutert:

Tag 1 - 2 (6 Tiere):

Plasmaprogesteron-Konzentration < 0.5 ng/ml.

Ovar: Ovulationsgrube mit Blutkoagulum bzw. Corpus luteum in Anbildung, ursprüngliche Follikelhöhle noch feststellbar.

Cervix: offen, mehr oder weniger Schleim, evtl. mit Blutbeimengungen.

Tag 3 - 7 (8 Tiere):

Plasmaprogesteron-Konzentration > 0.5 ng/ml.

Ovar: kleines, hochrotes, zartes Corpus luteum in Anbildung

Cervix: geschlossen, wenig visköser Schleim

Tag 8 - 17 (22 Tiere):

Plasmaprogesteron-Konzentration > 3.0 ng/ml

Ovar: großes Corpus luteum, stark durchblutet, deutliche Gefäßzeichnung, Konsistenz weich.

Cervix: geschlossen, kein oder nur sehr wenig, pappiger Schleim.

Tag 18 - 19 (9 Tiere):

Plasmaprogesteron-Konzentration $0.5 - 3.0$ ng/ml

Ovar: Corpus luteum mit derber Konsistenz und mit Bindegewebskapsel, Gefäßzeichnung undeutlich

Cervix: geringfügig geöffnet, wenig Schleim.

Tag 20 - 21 (5 Tiere):

Plasmaprogesteron-Konzentration < 0.5 ng/ml

Ovar: großer bzw. Graaf'scher Follikel.

Cervix: offen, klarer, flüssig-fadenziehender Brunstschleim in großer Menge.

Bei 4 Tieren wiesen große Blasen ($\varnothing > 3$ cm) bzw. zahlreiche kleinere Follikel und das Fehlen von Corpora lutea auf Follikelzysten hin.

b) Proben von Kalbinnen mit definiertem Zyklusstand

Für eine zweite Serie von Endometriumproben wurden 33 Fleckviehkalbinnen einige Wochen vor der Schlachtung zur genauen Zyklusbeobachtung in der Versuchsstation Veitshof aufgestellt.

Die Zyklusbeobachtung erstreckte sich auf die Beobachtung der äußeren Zeichen der Brunst, auf die regelmäßige Entnahme von Blutproben und Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Progesteron und LH.

Während der Lutealphase wurden alle zwei bis drei Tage, im Brunstzeitraum täglich und an den Tagen, an denen der LH-Gipfel zu erwarten war, im Abstand von 8 h, Blutproben aus der V.jugularis oder aus der V.o.A.caudalis mediana durch Punktion gewonnen. Der Tag nach dem LH-Gipfel wurde als Tag 1 des Zyklus bezeichnet.

Dabei konnte bei 24 Tieren der LH-Gipfel eindeutig und bei drei Tieren zusammen mit den anderen Beobachtungen mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert werden.

Bei 6 Tieren beruht die Zyklusbestimmung nur auf Brunstbeobachtung und Plasmaprogesteron-Kurven.

25 Kalbinnen wurden im Verlauf des Zyklus an definierten Tagen geschlachtet. 5 Tiere wurden künstlich besamt und am Tag 20 bzw. 21 geschlachtet. Bei der Schlachtung dieser Tiere ergaben sich bei keinem irgendwelche Hinweise auf eine Trächtigkeit. 3 der Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der Schlachtung in Brunst bzw. in Luteolyse, bei zweien war das C.l. noch funktionsfähig, evtl. war der Embryo kurz vor der Schlachtung abgegangen, der Zyklusstand dieser beiden Tiere war somit unklar.

c) Endometriumproben nach Ocytocindauerinfusion

Um den Einfluß der endogenen Ocytocinkonzentration auf die Konzentration des Ocytocinrezeptors bzw. auf dessen Meßbarkeit abzuklären, wurden 3 Fleckviehkalbinnen nach einer zwei Tage dauernden Ocytocindauerinfusion geschlachtet. Diese Tiere sollten am Tag 21, an dem die höchste Ocytocinrezeptorkonzentration zu erwarten war, geschlachtet werden. Da bei einer Kalbin die Brunst früher als erwartet eintrat, gelang dies nur bei zwei Tieren, das dritte Tier wurde am Tag 2 geschlachtet.

Während der Ocytocininfusion wurden zur Kontrolle der erreichten Plasmaocytocinspiegel, zur Bestimmung des LH-Gipfels und der Progesteronspiegel in sechsstündigem Intervall Blutproben entnommen.

d) Proben von anderen Geweben und Tierarten

Es wurde auch versucht, Ocytocinrezeptoren in Eileiter und Corpus luteum des Rindes und im Endometrium des Schweines nachzuweisen.

Die Eileiter wurden ebenfalls den 28 an definierten Zyklustagen geschlachteten Kalbinnen entnommen. Untersucht wurden dann allerdings nur 5 Eileiter, die den Zyklustagen 19, 21 (2 Tiere), 2 und 4 zuzuordnen waren.

5 Corpora lutea entstammten Ovarien, die von unbekannten Tieren am Schlachthof entnommen wurden. Die Bestimmung des Zyklusstandes beschränkte sich auf die Beurteilung der Ovarien. Bei zwei Corpora lutea handelte es sich um frühe Lutealstadien um den Tag 5 des Zyklus, zwei Gelbkörper waren in Blüte und einer nach der makroskopischen Beurteilung in Regression.

6 Schweineendometriumproben von definiert an den Tagen

10 u. 16 des Zyklus und während der Rausche geschlachteten Tieren wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. F. Ellendorf vom Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Mariensee, überlassen.

2. Probengewinnung

Alle Tiere wurden am Schlachthof in Landshut geschlachtet. Für die großzügige Gewährung von Arbeitsmöglichkeiten und die hilfreiche Unterstützung bei der Probennahme danken wir dem Personal des Schlachthofes. An der Bandschlachtanlage dieses Schlachthofes vergingen etwa 20 Minuten zwischen der Tötung des Tieres und dem Ausweiden, bei dem auch der Uterus entnommen wurde.

Sofort nach der Entnahme des Uterus wurden in wenigen Minuten noch am Schlachthof 2 mal 3 g Endometrium mit Pinzette und Skalpell präpariert. Die Proben wurden jeweils zur Hälfte dem linken und rechten Uterushorn aus einem etwa 8 cm breiten Bereich nahe dem Corpus uteri entnommen, in Alufolien abgepackt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren.

Um eine saubere Präparation des Endometriums sicherzustellen, wurden anfänglich einige Proben histologisch untersucht. An dieser Stelle sei Frau Prof. Dr. I. Rüsse vom Lehrstuhl für Tieranatomie II der Universität München, die diese Untersuchungen durchführte, besonders gedankt.

Bis zur Weiterverarbeitung blieben die Proben im flüssigen Stickstoff.

Jeweils am Tag vor den verschiedenen Bestimmungen wurden die Proben homogenisiert. Dies geschah nach dem sogenannten Sprödbbruchverfahren mit dem Mikro-Dismembrator II (Braun Melsungen) in gefrorenem Zustand bei -196°C . Nach einer groben Zerkleinerung mit dem Hammer wurden die Gewebestückchen in ein in flüssigem Stickstoff vorgekühltes

Teflongefäß zusammen mit einer Wolfram-Carbid-Kugel verbracht. Auf dem Mikro-Dismembrator wurde das Gefäß hochfrequent geschüttelt, wobei die im Gefäß hin und her fliegende Kugel die Gewebstückchen zu feinem Pulver zertrümmerte. Die Proben wurden 5 mal 50 sec in dieser Weise behandelt. Dazwischen wurden die Teflongefäße immer wieder für etwa 60 Sekunden in flüssigem Stickstoff gekühlt, um ein Tauen der Proben zu vermeiden.

Nach der Homogenisation wurde das Pulver in Zentrifugenröhrchen überführt und wieder bis zur Weiterverarbeitung am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

3. Lagerung und Haltbarkeit der Proben

Das Endometrium wurde, wie bereits erwähnt, sofort nach dem Ausweiden der Tiere präpariert und in zwei getrennten Fraktionen zu ca. 3 g in nicht homogenisiertem Zustand in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Homogenisation erfolgte immer erst am Tag vor der Bestimmung der Steroidrezeptoren. Während der Homogenisation und bis zur Durchführung der Bestimmungen blieb das Gewebe immer in flüssigem Stickstoff. Die durch Zentrifugation nach dem Homogenisieren gewonnene Fraktion (s.S.29), in der die Konzentration des Ocytocinrezeptors bestimmt werden sollte, wurde bei - 60° C in einem Gefrierschrank aufbewahrt.

Alle Arbeiten bei der Bestimmung (Suspendieren des Homogenates, Zentrifugieren, Inkubation und dgl.) wurden bei 0° C im Eisbad und, soweit möglich, im Kühlraum durchgeführt.

Die Lagerung von nicht homogenisierten Proben dauerte von mindestens einer Woche bis maximal achteinhalb Monate, die Fraktionen zur Bestimmung des Ocytocinrezeptors wurden bis zu 7 Monaten aufbewahrt. Zwischen der Erstbestimmung einer Probe und der Wiederholung der Bestimmung vergingen bei einigen Proben mehr als sechs Monate. Wie die später

Tab.1

Probe	cytosol. Östrogen- rezeptor		Östrogenkern- rezeptor		cytosol. Gestagen- rezeptor		Ocytocin- rezeptor	
	1.Best.	2.Best.	1.Best.	2.Best.	1.Best.	2.Best.	1.Best.	2.Best.
1	0.484	0.558	0.374	0.465	1.234	2.250	560	586
2	0.217	0.259	0.831	0.847	1.385	2.251	1505	1606
3	0.055	0.032	0.134	0.071				
4	1.684	1.209	0.452	0.547	5.925	6.491	399	375
5	0.065	0.034	0.075	0.100	0.557	0.885	687	974
7	1.223	1.476	0.336	1.172	9.007	7.412	307	366

Tab.1: Alle Angaben für die Steroidrezeptoren verstehen sich in pmol/mg DNA, die Konzentrationen des Ocytocinrezeptors sind in fmol/mg Protein angegeben.
Zwischen erster und zweiter Bestimmung der oben angeführten Proben lagen jeweils ca. 6 Monate. (Bei Probe 3 wurde die Bestimmung des Gestagenrezeptors und des Ocytocinrezeptors nicht wiederholt.)

genauer dargestellten Reproduzierbarkeiten und nebenstehende Tabelle (Tab.1) zeigen, hat die Dauer der Lagerung keinen deutlichen Einfluß auf die Rezeptorkonzentration.

4. Substanzen und Geräte

Hormone

Die Tritium-markierten Hormone, ^3H -Ocytocin (spez.Akt.27 u.18 Ci/mmol), ^3H -Östradiol-17 β (140 u. 142 Ci/mmol) und ^3H -Organon 2058 (51 Ci/mmol), waren von Amersham, ebenso das nicht markierte Organon 2058.

Nicht markiertes Ocytocin war von Sandoz, Östradiol-17 β , Östron, Progesteron und Testosteron von Sigma.

Chemikalien

Trypsin aus Rinderpankreas mit 3.5 U/mg, E.C.3.4.21.4, war von Merck.

Bovines Serumalbumin (BSA) als Standardprotein für die Proteinbestimmungen war von Serva, Kälberthymus-DNA für die Eichkurve der DNA-Bestimmung von Calbiochem-Behring, DNA-Reagenz Hoechst 33258 von Hoechst.

Agar purum ORDX für die Gele der Elektrophorese stammte von Behring.

Die Szintillatoren Rialuma^R (Zählausbeute 35-40 %) und Xylofluor^R (Zählausbeute 50 %) waren von Baker.

Tris-Puffer, EDTA, MnCl_2 , HCl , Glycerin, MgCl_2 , NaH_2PO_4 , Na_3PO_4 , CuSO_4 , Na_2 -Tartrat, NaOH , SDS, Bromphenolblau, 100 % Äthanol, Eisessig (reinst), BrCN , Gelatine, waren von Merck; DTT, Agarose (Perlform), pulverisierte Aktivkohle (Partikelgröße 4-7 μm),

Dextran (MG 60 000 - 90 000) waren von Serva;
Tween 80 von Sigma, Surfynol von Biesterfeld, Heparin
(6 U/mg) von Diosynth und Methanol (100 %) von Baker. Alle
Chemikalien waren von analytischer Qualität.

Geräte

Zur niedertourigen Vorzentrifugation der Proben wurde
eine Beckman-Zentrifuge J 21 mit dem Rotor JA 10 verwendet.
Die partikelfreien Überstände und das Hochgeschwindigkeits-
Pellet zur Ocytocinrezeptorbestimmung wurden in einer
Beckman-Ultrazentrifuge mit den Rotoren SW 56 (mit Kontron-
Polyallomer-Tubes, 6 ml Volumen) und TST 41 (mit Kontron-
Polyallomer-Tubes, 14 ml Volumen) gewonnen.

Der Ultraschallhomogenisator war von MSE.

Zur Homogenisation der Proben bei - 196° C diente der
Mikro-Dismembrator II von Braun-Melsungen.

Ein 8-Kanal-Mikrotitrationsplatten-Photometer von Flow
wurde bei den Proteinbestimmungen verwendet.

Die Fluoreszenz-Messung bei der DNA-Bestimmung erfolgte
an einem Fluoreszenz-Spectrophotometer von Perkin-Elmer.

Verschiedenes

Die Fluoreszenz-Bestimmung erfolgte in Polyacrylat-Ein-
mal-Kuvetten von Sarstedt.

Die Mikrotitrationsplatten für die Proteinbestimmungen
stammten von Nunc.

B Rezeptorbestimmungen

1. Aufbereitung der Homogenate

Aus einer Probe wurden folgende Daten ermittelt:

1. Konzentration des cytosol. Östrogenrezeptors
2. Konzentration des Östrogenkernrezeptors
3. Konzentration des cytosol. Gestagenrezeptors
4. Konzentration des Ocytocinrezeptors.

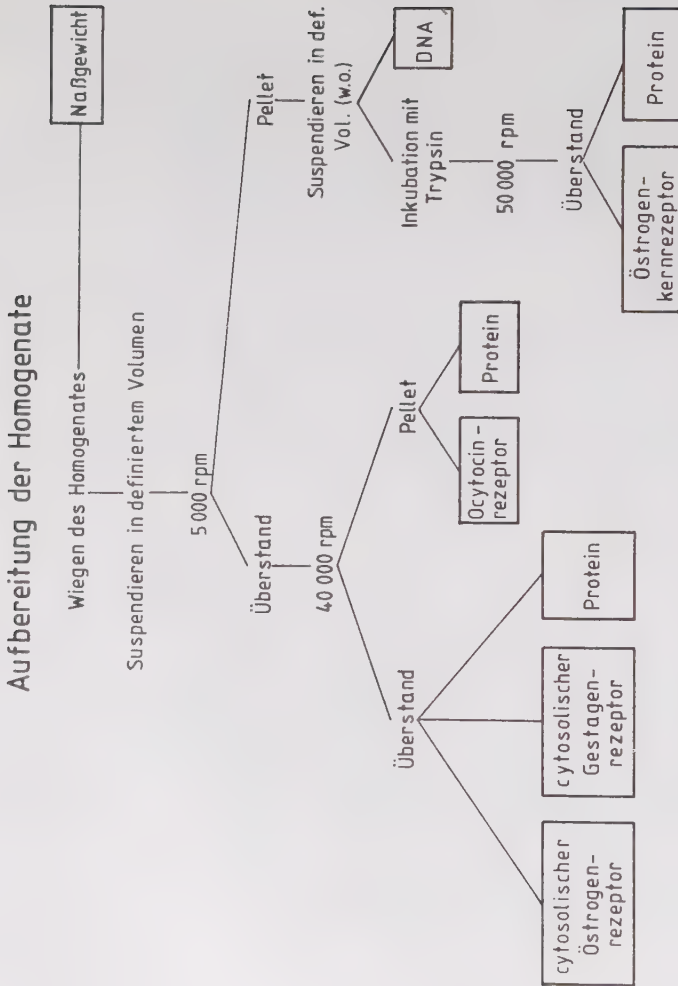
Als Bezugsgrößen für diese Rezeptorkonzentrationen wurden bestimmt:

1. DNA - Konzentration im Homogenat
2. Protein - Konzentration im Cytosol
3. Protein - Konzentration im Kernextrakt
4. Protein - Konzentration in der Ocytocinrezeptorfraktion
5. Naßgewicht des Gewebes.

Abb. 1 soll die Aufarbeitung der Proben veranschaulichen.

Nach dem Homogenisieren wurden die Proben in Zentrifugenröhrchen mit bekanntem Leergewicht überführt. Während des Auftauens am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur Ermittlung des Naßgewichtes mit den Homogenaten nochmals gewogen. Danach wurden die Homogenate, deren Gewicht zwischen 2.5g und 3.5g lag, in einem 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6, mit 3 mM DTT (Dithiothreitol), 1.5 mM EDTA und 10 % Glycerin (TEDG-Puffer) suspendiert. Um definierte Volumina zu erhalten, wurde der Puffer eingewogen und zu einem Gesamtgewicht (Homogenat plus Puffer) von 15.0 g aufgefüllt.

Abb.1



Nach vollständigem Auftauen der Homogenate wurde die Suspension zum ersten Mal zentrifugiert. Dies geschah in einer Beckman Kühlzentrifuge J 21 mit dem Rotor JA 10 bei 2 300-3 300 g_{av} (5 000 rpm) für 30 Minuten bei + 1  C.

Der Überstand wurde nochmals in einer Ultrazentrifuge (Beckman) bei ca. 280 000 g_{av} (40 000 rpm) mit dem Rotor TST 41 60 Minuten bei + 1  C zentrifugiert um einen partikel-freien Überstand, das Cytosol, zu erhalten.

Das aus der Ultrazentrifugation hervorgehende Pellet mit einem Gewicht von 10 - 30 mg wurde für die Bestimmung des Ocytocinrezeptors verwendet. Da diese Bestimmung nicht am gleichen Tag erfolgen konnte, wurde das Pellet bei - 60  C eingefroren.

Das 5 000 rpm-Pellet wurde zur Bestimmung der Konzentration des Östrogenkernrezeptors und der DNA-Konzentration verwendet. Es wurde sofort nach der Zentrifugation in einem 10 mM NaH₂PO₄- Puffer (pH 7.5) mit 3 mM DTT und 0.5 % Surfynol (PSD-Puffer) in dem gleichen Volumen wie vorher das Homogenat resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde ein Aliquot von 5.0 g für die später erfolgende DNA-Bestimmung abgewogen und bei - 20  C eingefroren. Ein zweites Aliquot von 4.5 g wurde zur Extraktion und Bestimmung des Östrogenkernrezeptors abgewogen.

2. Bestimmung des Ocytocinrezeptors

a) Prinzip

Zur Bestimmung der Konzentration des Ocytocinrezeptors wurde auch routinemäßig immer eine 5-Punkte-Scatchard-Analyse durchgeführt. Die Rezeptorsuspension wurde mit 5 verschiedenen Konzentrationen an ³H-Ocytocin, von 10 nM bis 0.8 nM und parallel dazu mit 100 bis 1250fachem Überschuß an kaltem

Ocytocin inkubiert. Die Trennung von gebundenem und freiem Hormon erfolgte durch schnelle Filtration über einen Membranfilter, in dem anschließend direkt die Aktivität bestimmt wurde.

b) Routinebestimmung

Das 40 000 rpm-Pellet (s.S. 29) wurde unmittelbar vor Beginn des Tests in 2 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6, sorgfältig suspendiert und die Suspension, die 2-4 mg Protein/ml enthielt, während des Tests in einem Eisbad aufbewahrt. Anschließend wurden im Abstand von 3 min immer paarweise jeweils ein Ansatz für die Gesamtbindung und einer für die unspezifische Bindung in ein Reagenzglas pipettiert. In den Ansatz für die Gesamtbindung kamen 50 μ l der Rezeptorsuspension, 50 μ l der ^3H -Ocytocin-Lösung, die ungefähr 30, 18, 12, 6 oder 3 nM ^3H -Ocytocin, 15 mM MnCl_2 in 45 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6, enthielt, und 50 μ l 45 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6. In den Ansatz für die NSB kamen anstelle des letztgenannten Puffers eine 3 μ M Ocytocin-Lösung in 45 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6. Die Ansätze enthielten dann etwa 0.7 - 1.4 mg/ml Protein, 10, 6, 4, 2 oder 1 nM ^3H -Ocytocin, 5 mM MnCl_2 und 33 mM Tris-HCl, pH 7.6. In den Ansätzen für die NSB waren zusätzlich 1 μ M Ocytocin enthalten.

Die Inkubation dauerte 60 Minuten bei 20° C in einem Wasserbad. Sie wurde beendet durch die Zugabe von 3 ml eiskaltem 45 mM Tris-HCl-Puffer und durch zügige Vakuumfiltration über Zelluloseazetat-Membranfilter von Sartorius mit einer Porengröße von 0.2 μ m und einem Durchmesser von 25 mm. Das Reagenzglas wurde noch zweimal mit 3 ml eiskaltem Puffer nachgespült und dieser Puffer dann ebenfalls über die Filter gegeben. Von der ersten Zugabe des Puffers bis zur Beendigung der Filtration einschließlich des Spülens vergingen 25 - 35 sec. Die Membranfilter wurden dann in ein Szintillationsröhr-

chen überführt, 12 ml Rialuma^R zugegeben und die Aktivität nach 30 min kräftigem Schütteln bestimmt.

c) Auswertung

Da die Scatchard-Analyse mit 5 verschiedenen Hormonkonzentrationen durchgeführt wurde und jeder Punkt doppelt bestimmt wurde, erhielt man 10 Wertepaare, jeweils TB und NSB, in cpm.

Die molare Konzentration an Bindungsstellen für Ocytocin ergab sich aus der Formel:

$$\text{cpm} \times 100$$

Ausbeute x spez. Aktivität x Umrechnungsfaktor x Volumen

Die einzelnen Parameter betragen:

Ausbeute: 38,8 % (Rialuma^R)

spez. Akt: 18×10^3 Ci/mol (³H-Ocytocin)

Umrechnungsfaktor Ci-dpm: $2,22 \times 10^{12}$

Volumen: 150×10^{-6} l

Faßt man alle gleichbleibenden Faktoren zusammen, ergibt sich die molare Konzentration aus folgender Multiplikation:

$$\text{cpm} \times 0.4299 = [\text{B}] [\text{pM}]$$

Die Scatchard-Auftragung ist eine Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung. Diese Sättigungskurve, die sich asymptotisch einem Grenzwert, der maximalen Bindungskapazität, nähert, wurde von Scatchard (SCATCHARD 1949) umformuliert, so daß eine Gerade mit negativer Steigung entstand, deren Schnittpunkt mit der Abszisse jetzt die maximale Bindungskapazität darstellt. Die Dissoziationskonstante ergibt sich bei dieser Auftragung aus dem

Reziprokwert der Steigung.

Für die Scatchard-Auftragung wird auf die Abszisse die Konzentration des gebundenen Hormons [B] und auf die Ordinate der Quotient aus gebundenem und freiem Hormon, B/F, aufgetragen. Durch die so gefundenen Punkte wird eine Regressionsgerade gelegt und deren Schnittpunkt mit der Abszisse errechnet. Die Konzentration des gebundenen Hormons errechnet sich aus der Differenz von Gesamtbindung und unspezifischer Bindung.

Da es bei dem vorliegenden Versuchsaufbau zu schwierig war, das Filtrat quantitativ aufzufangen, konnte die Konzentration des freien Hormons nicht direkt bestimmt werden. Sie ergab sich rechnerisch aus der Differenz von Gesamtaktivität und gebundenem Hormon. Der Parameter B/F errechnet sich daher aus folgender Formel:

$$\frac{B}{F} = \frac{B}{TA - B} \quad (TA = \text{Gesamtaktivität})$$

Da B/F eine dimensionslose Zahl ist, kann unmittelbar mit cpm gerechnet werden.

Ein Beispiel für die vollständige Auswertung einer Bestimmung ist in Tab. 2 und in Abb. 2 gegeben.

Als Bezugsgröße für den Ocytocinrezeptor wurde die Proteinkonzentration in der Suspension verwendet. Für die Proteinbestimmung wurde während des Tests ein Aliquot aus der Suspension entnommen. Die Rezeptorkonzentration errechnete sich bei Berücksichtigung der 1 : 3 Verdünnung der Suspension im Inkubationsansatz aus der Formel:

$$B_{\max}/\text{mg Protein} = \frac{B_{\max} \times 3}{[\text{Protein}]}$$

Tab. 2

Die Gesamtaktivität betrug zwischen 31 306 und 1 140 cpm pro 150 µl (Ansatzvolumen), die Gesamtbindung bewegte sich zwischen 1 856 und 547 cpm pro Ansatz, die NSB lag zwischen 577 und 51 cpm pro Ansatz. Die Aktivität wurde bei einer Zählrohrbeute von 38.8 % mit Rialuma^R bestimmt. Die Proteinkonzentration in der Rezeptorsuspension war 2.7 mg/ml. Bei dieser Bestimmung wurde ³H-Ocytocin mit einer spezifischen Aktivität von 27 Ci/mmol verwendet.

Uterus 27

[³ H-OT]	B/A	NSB	r.B.	B/F	[B]
[nM]	[fmol]	%	%		[pM]
9.08	55.0	31.1	4.0	0.0421	366.5
9.08	54.9	29.8	4.0	0.0420	366.2
5.27	50.0	20.9	6.3	0.0675	333.0
5.27	49.5	22.3	6.3	0.0669	330.2
1.73	30.9	12.6	11.9	0.1353	206.2
1.73	31.6	12.1	12.2	0.1389	211.0
0.86	23.0	7.9	17.8	0.2160	153.2
0.86	21.3	9.4	16.5	0.1971	142.1
0.33	10.7	3.9	21.9	0.2800	71.5
0.33	9.8	5.0	20.1	0.2512	65.6

[³H-OT] = Ocytocinkonzentration

B/A = spezifische Bindung im Ansatz

NSB = nicht spezifische Bindung

r.B. = relative Bindung

B/F = Bound/Free

[B] = Konzentration an spezifisch gebundenem
³H-Ocytocin

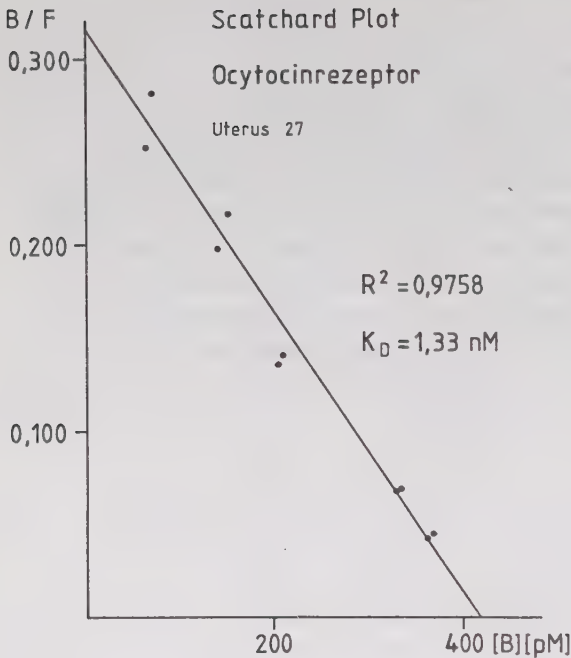


Abb.2: Scatchard Plot des Oxytocinrezeptors

Die Rezeptorkonzentration im Ansatz lag in der Größenordnung von pM, daraus ergab sich die Angabe der Rezeptorkonzentration bezogen auf mg Protein in fmol/mg.

Zwischen der Linearität des Scatchard-Plots und der Konzentration an Bindungsstellen zeigte sich ein klarer Zusammenhang. Die Beobachtung, daß bei sehr niedrigen Rezeptorkonzentrationen keine Gerade in der Scatchard-Analyse mehr zu erhalten war, führte zu der Festlegung der Meßbereichsgrenze in Abhängigkeit vom Korrelationskoeffizienten R^2 . Demnach waren in Proben Oxytocinrezeptoren nicht mehr nachweisbar, wenn R^2 unter 0.5 lag. Die Rezeptorkonzentrationen dieser

Proben wurden als 0 angegeben. Die gestrichelte Linie in Abb. 19 auf Seite 71 zeigt darüberhinaus, ab welcher Rezeptorkonzentration der Nachweis eindeutig war. Davon wurde bei R^2 über 0.8 ausgegangen.

d) Validierung

Vor den Bestimmungen wurde das ^3H -Ocytocin auf seine Reinheit mit HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) untersucht und nur verwendet, wenn sie größer als 95 % war.

Die Sättigungskinetik des Ocytocinrezeptors wird durch die Scatchard-Analysen eindeutig belegt. Die meisten der Regressionsgeraden weisen einen Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0.9$ auf.

Zur weiteren Absicherung der Bestimmung wurde lediglich der Frage nachgegangen, inwieweit endogen vorhandenes Ocytocin die Meßbarkeit seines Rezeptors zu beeinflussen vermag.

Zur Klärung dieser Frage wurde einerseits der eingangs bereits beschriebene Infusionsversuch unternommen. Auf dessen Resultat wird später im Ergebnisteil noch näher eingegangen.

Andererseits wurde bei der Aufbereitung der Proben versucht, eventuell vorhandenes Ocytocin vom Rezeptor zu lösen und aus der Probe auszuwaschen.

Aus der Literatur (PEARLMUTTER et al. 1979) ist bekannt, daß für die Bindung des Ocytocins an den Rezeptor ein zweiwertiges Kation notwendig ist. Dabei haben insbesondere Mn^{++} und Mg^{++} eine fördernde Wirkung auf die Bindung. 1.5 mM EDTA in dem Puffer, in dem die Homogenate suspendiert werden, entzieht diese Kationen weitgehend der Hormon-Rezeptor-Bindung und Ocytocin dissoziiert vom Rezeptor.

Außerdem inaktiviert das in diesem Puffer vorhandene DTT das Ocytocin, vermutlich durch Reduktion der Disulfidbrücke. Um den Einfluß des DTTs und des EDTAs auf die Ocytocin-Bindung am Rezeptor genauer zu charakterisieren, wurde

folgender Versuch unternommen:

Bei zwei Proben wurde parallel zu einer Scatchard-Analyse, wie oben beschrieben, zu den Ansätzen für die Gesamtbindung statt des Tris-Puffers entweder ein 45 mM Tris-HCl-Puffer mit 30 mM EDTA oder mit 9 mM DTT gegeben, inkubiert und wie üblich filtriert. (Im Ansatz lagen somit EDTA in einer Konzentration von 10 mM bzw. DTT von 3 mM vor.) Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Form von Sättigungskurven in Abb. 3 (Tab. s.S.100) für eine der beiden Proben dargestellt.

Die Konzentration des EDTA mußte so hoch gewählt werden, weil bei der Bestimmung 5 mM MnCl_2 zugesetzt wurden und gewährleistet sein sollte, daß alle zweiwertigen Kationen eliminiert werden. Der Versuch zeigt, daß sowohl DTT alleine als auch EDTA alleine imstande sind, die Bindung des Ocytocins an den Rezeptor vollständig aufzuheben. Selbst wenn man davon ausgeht, daß 1.5 mM EDTA in dem Puffer, in dem die Homogenate zuerst suspendiert wurden, nicht ausreichten, alle relevanten Kationen zu eliminieren, so war in jedem Fall die DTT-Konzentration ausreichend, um eventuell vorhandenes endogenes Ocytocin zu inaktivieren. Das endogene Ocytocin beeinflusste daher die Meßbarkeit des Rezeptors nicht nennenswert, was im übrigen auch der später erörterte Infusionsversuch zeigte.

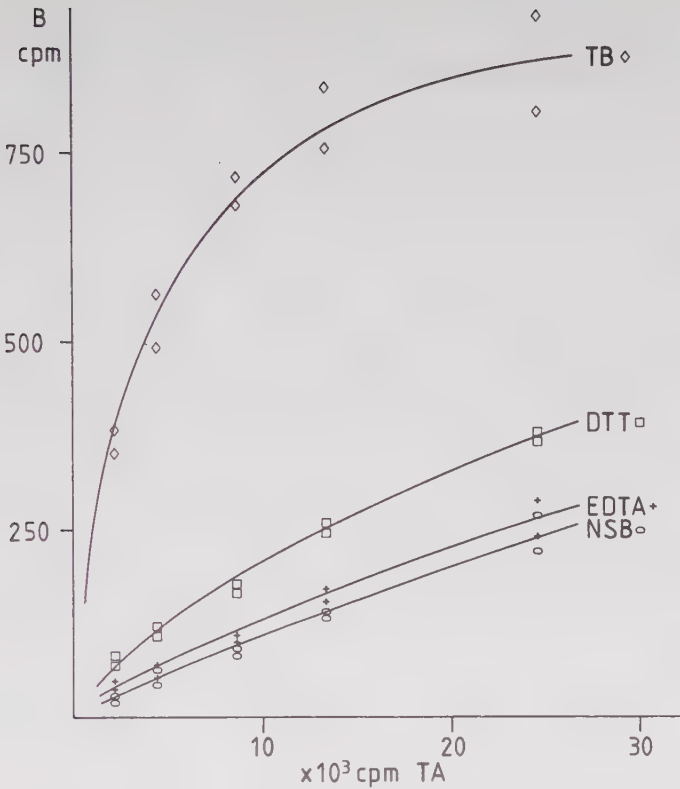


Abb.3: Einfluß von DTT und EDTA auf die Bindung von Oxytocin an den Rezeptor bei Inkubation des Rezeptors mit 3 mM DTT bzw. 10 mM EDTA. (TB = Gesamtbindung; NSB = unspezifische Bindung; TA = Gesamtaktivität)

Zuletzt wurde auch die Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Oxytocinrezeptors an insgesamt 19 Proben überprüft. Dies ist in Abb. 4 (Tab. s.S.100) dargestellt. Daraus ist die gute Reproduzierbarkeit der Bestimmung ersichtlich.

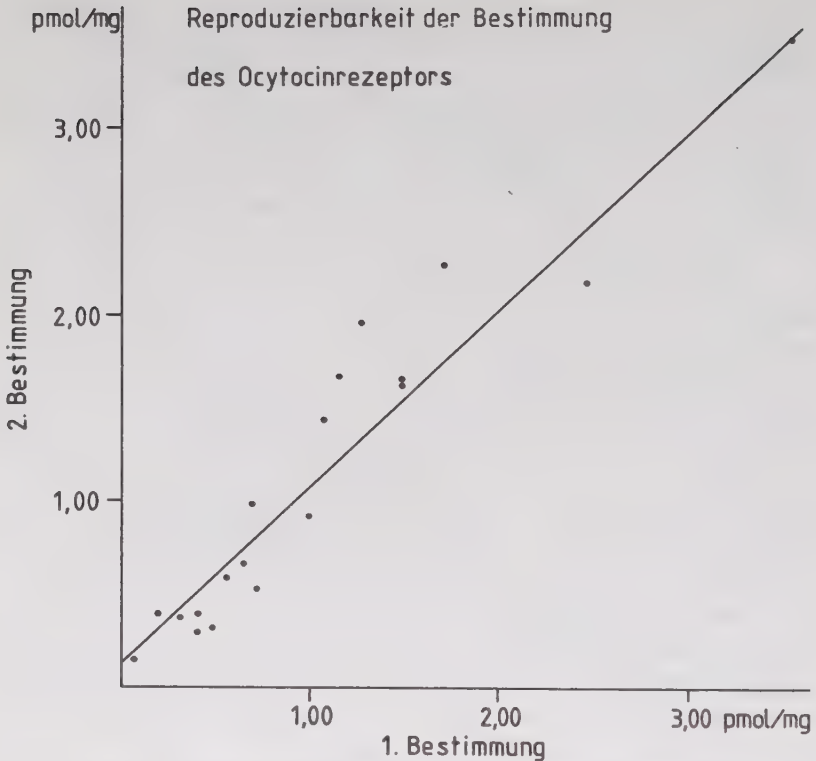


Abb.4: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Ocytocinrezeptors. Auf die Abszisse ist das Resultat der 1. Bestimmung, auf die Ordinate das der Wiederholung aufgetragen. (Angaben in pmol/mg Protein) Steigung $a = 0.9814$; Schnittpunkt mit der y-Achse $b = 0.1300$; $R = 0.9577$; $n = 19$;

An die Zelluloseazetat-Membranfilter wurde keine nennenswerte Aktivität gebunden. Die Bindung an die Filter bewegte sich, abhängig von der jeweiligen Konzentration an ^3H -Ocytocin, von 10 - 50 cpm/Filter und war durch nicht markiertes Ocytocin nicht verdrängbar. Da die spezifische Bindung aus

der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Bindung errechnet wurde, ging dieser Wert ohnehin nicht in die Berechnung der Rezeptorkonzentration ein.

3. Bestimmung des cytosolischen Östrogenrezeptors

a) Prinzip

Zur Bestimmung der Konzentration des cytosolischen Östrogenrezeptors wurde das Cytosol mit sättigenden Konzentrationen an tritiummarkiertem Östradiol-17 β inkubiert. Die nicht spezifische Bindung (NSB) wurde parallel in einem Ansatz mit 50fachem Überschuß an nicht markiertem Hormon ermittelt. Nach der Inkubation wurde das Cytosol zur Trennung von freiem und gebundenem ^3H -Östradiol-17 β und zur Anreicherung des Rezeptors auf ein Heparin-Sepharose-Säulchen aufgetragen (MOLINARI, MEDICI, MONCHARMONT, PUCA 1977; MEYER 1980). Der Rezeptor wurde dabei an der Heparin-Sepharose gebunden, das freie Hormon beim Spülen ausgewaschen. Danach wurde die Aktivität in dem gesamten Heparin-Sepharose-Säulchen bestimmt und aus der Differenz von Gesamtbindung und nicht spezifischer Bindung die Konzentration des Rezeptors errechnet.

b) Routinebestimmung

Während der 40 000 rpm-Zentrifugation wurden in einem Reagenzglas 100 μl einer 100 nM ^3H -Östradiol-17 β -Lösung (97 % Methanol, 3 % Glycerin) und in einem weiteren Reagenzglas zusätzlich 100 μl einer 5 μM Östradiol-17 β Lösung evaporiert. Nach dem vollständigen Verdampfen des Methanols wurden in die beiden Reagenzgläser jeweils 500 μl des Cytosols pipet-

tiert. Dem Cytosol wurde vorher noch aus einer konzentrierten Stammlösung $MgCl_2$ zugesetzt, so daß dies in einer Konzentration von 6 mM im Cytosol enthalten war.

In den 500 μ l Cytosol waren somit 20 nM 3H -Östradiol-17 β und in dem Parallelansatz für den NSB-Wert zusätzlich noch 1 μ M Östradiol-17 β enthalten.

Das Cytosol wurde anschließend 2h 30 min bei 0° C im Eisbad und im Kühlraum inkubiert.

Zur Beendigung der Inkubation wurden 100 μ l des Cytosols auf ein Heparin-Sepharose-Säulchen mit einem Gelbettvolumen von 250 μ l aufgetragen. Nach zehnmütigem Einsinken des Cytosols in das Gel wurde das Säulchen 6 mal mit jeweils 1 ml PSD-Puffer (s.S.29) gespült.

Schließlich wurden die 250 μ l Heparin-Sepharose in toto mit 1 ml Aqua bidest. in ein Szintillationszählröhrchen überführt, 3 ml Szintillator (Xylofluor^R, Baker) zugegeben und zur Extraktion der Aktivität aus dem Gel über Nacht langsam geschüttelt. Die eingesetzte Gesamtaktivität wurde zusätzlich in 100 μ l - Aliquots aus dem Cytosol bestimmt. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der Aktivität in einem β -Counter.

c) Auswertung

Die spezifisch gebundene Aktivität in einem Cytosol ergibt sich aus der Differenz von Gesamtbindung und unspezifischer Bindung. Während die im Cytosol nicht spezifisch gebundene Aktivität relativ konstant in der Größenordnung von 1 000 - 2 000 cpm lag, variierte die Gesamtbindung entsprechend der Rezeptorkonzentration von 1 000 - 2 000 cpm bis 33 000 cpm pro 100 μ l Cytosol. Als Gesamtaktivität wurden 310 000 cpm/100 μ l Cytosol eingesetzt, die relative Bindung lag maximal bei 12.6 %. Die Umrechnung von cpm in die molare Konzentration erfolgte nach der auf Seite 31 bereits er-

läuterten Formel, die spez. Aktivität von ^3H -Östradiol-17 β betrug 140 Ci/mmol, die Ausbeute mit Xylofluor^R war 50 % und als Analysenvolumen wurden 100 μl eingesetzt.

d) Validierung

Zur Validierung der hier verwendeten Bestimmungsmethode wurden parallel zur Routinebestimmung jeweils für einige Proben folgende Untersuchungen durchgeführt: Scatchard-Analyse, Agargelelektrophorese, Austestung von Kreuzreaktionen mit einigen anderen Steroiden und die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Resultate.

Für eine Scatchard-Analyse sollten Rezeptorkonzentration und Hormonkonzentration im Bereich der Dissoziationskonstanten liegen. Es wurde daher ein Endometrium mit einer hohen Konzentration an Bindungsstellen ausgewählt und das Cytosol so verdünnt, daß die Rezeptorkonzentration in etwa die Größenordnung der aus der Literatur bekannten Dissoziationskonstanten erreichte. Die K_D wird im Bereich von 0.2 nM erwartet.

Das Cytosol wurde mit 10 verschiedenen Konzentrationen an ^3H -Östradiol-17 β inkubiert. Zu diesem Zweck wurde eine 1:2 - Verdünnungsreihe von 100 nM bis 0.19 nM ^3H -Östradiol-17 β (in 97 % Methanol, 3 % Glycerin) hergestellt, so daß in jedem Reagenzglas 200 μl der Lösung blieben. Zu einer parallel hergestellten Verdünnungsreihe wurden jeweils zusätzlich 200 μl einer 5 μM Östradiol-Lösung pipettiert.

Nach der vollständigen Evaporation wurde in jedes Reagenzglas 1 ml des mit MgCl_2 versetzten Cytosols gegeben. Inkubation, Beendigung der Inkubation, Spülen der Säulchen und Aktivitätsbestimmung erfolgten wie bei der Routinebestimmung, es wurde lediglich das doppelte Volumen auf das Säulchen aufgetragen, um die Radioaktivität auch noch im Bereich niedriger ^3H - E_2 -Konzentrationen eindeutig bestimmen

zu können. Das Resultat der Scatchard-Analyse ist in Abb.5 dargestellt.

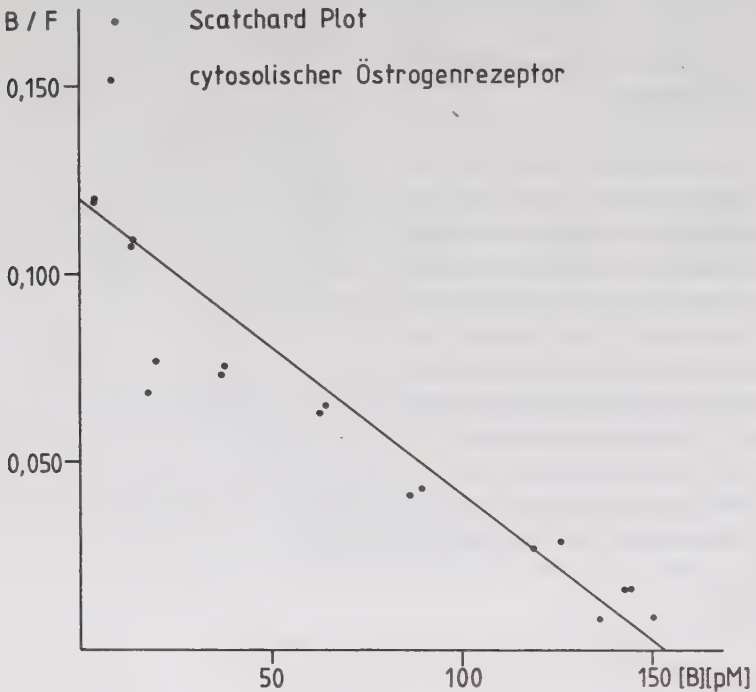


Abb.5: Scatchard Plot des cytosolischen Östrogenrezeptors. $K_D=1.29$ nM, $B_{\max}=154.9$ pM, $R^2=0.8178$. Das Cytosol war 1:8.4 verdünnt worden. Daraus ergibt sich für das unverdünnte Cytosol eine $B_{\max}$ von 1 301 pM. Bei der Routinebestimmung lag $B_{\max}$ bei 1 330 pM.

Das Volumen des Gelbettes mußte nicht erhöht werden, da die Kapazität, den Rezeptor zu binden, ohnehin wesentlich höher als die Rezeptorkonzentration ist und das Cytosol außerdem vorher verdünnt worden war.

Gleichzeitig wurde das Cytosol unverdünnt mit der oben beschriebenen Routinemethode untersucht. Dabei sei auf die gute Übereinstimmung der aus der Scatchard-Auftragung errechneten und der aus der Routinebestimmung ermittelten Rezeptorkonzentration hingewiesen.

Zur weiteren Absicherung der Methodik wurde eine Agar-gelelektrophorese durchgeführt.

Die Cytosole wurden, wie bei der Routinebestimmung, mit 20 nM ^3H -Östradiol-17 β und in einem Parallelansatz mit zusätzlich einem 50fachen Überschuß an nicht markiertem Östradiol inkubiert.

Vor dem Einsetzen von 100 μl - Aliquots in die Elektrophorese wurden zur Beendigung der Inkubation die Cytosole einer Kohlebehandlung wie folgt unterzogen: Zu 500 μl Cytosol wurden 100 μl einer 2 %igen Kohlesuspension mit 0.2 % Dextran (MG 60 000 - 90 000, Serva) in TEDG - Puffer (s. S.27) gegeben, 1 min geschüttelt, 4 min inkubiert und anschließend 10 min bei 3 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort nach der Zentrifugation dekantiert und 100 μl des Überstandes möglichst schnell und ohne Unterbrechung der Kühltaste auf die Gele übertragen.

Bei den Gelen handelte es sich um 0.8 % Agar ORDX (Behringwerke) in einem Puffer mit 50 mM HCl, der pH-Wert mit Tris auf 8.2 eingestellt. Daraus wurden Platten von 105 x 100 x 5 mm Größe gegossen und in diese Platten Löcher mit einem Volumen von 100 μl gestanzt (3 x 8 x 5 mm).

Die Elektrophorese wurde auf einer auf - 4° C gekühlten Glasplatte horizontal durchgeführt. Die Stromstärke betrug 85 mA, die Elektrophorese dauerte 180 Minuten. Die Gele wurden anschließend in 3 mm lange Fraktionen geschnitten und in Szintillationsröhrchen übertragen. Die Aktivität wurde über Nacht mit 3 ml Xylofluor^R unter langsamem Schütteln extrahiert und anschließend bestimmt. Abb. 6 zeigt das Ergebnis einer Elektrophorese.

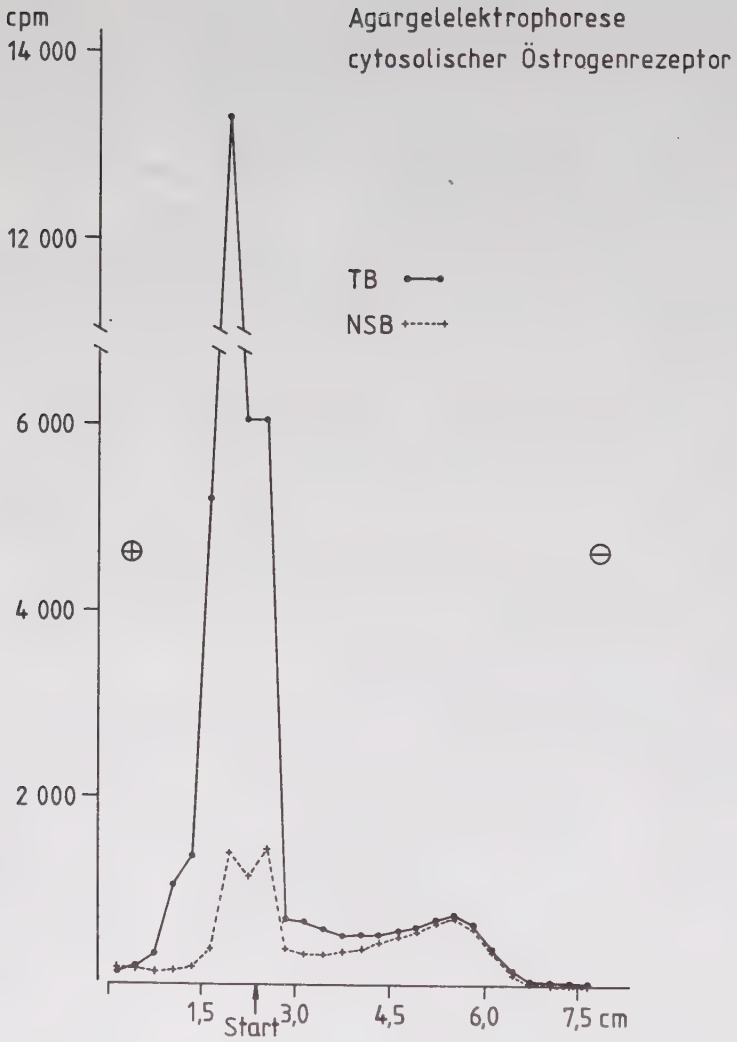


Abb.6: Elektrophorese des cytosolischen Östrogenrezeptors.

Der Gipfel befindet sich an der für den Östrogen- und Gestagenrezeptor typischen Position (WAGNER 1972). Der Hauptanteil des Rezeptors wandert unter den beschriebenen Bedingungen etwa 3 mm in Richtung der Anode. Der leichte Anstieg der beiden Kurven im Bereich von 5,4 cm ist auf bei der Kohlebehandlung nicht eliminiertes freies Hormon zurückzuführen. Er befindet sich in dem Bereich, in dem unter gleichen Elektrophoresebedingungen markiertes, nicht gebundenes Hormon wandern würde.

Um Hinweise für die Spezifität des Östrogenrezeptors für Östrogene zu erhalten, wurden Kreuzreaktionen des Rezeptors mit einigen anderen Steroiden, wie Östron, Testosteron, Progesteron und Organon 2058, einem synthetischen Progesteronanalog mit hoher Affinität und Spezifität zum Gestagenrezeptor (s.S.54), überprüft. Die Bestimmung erfolgte wie anfangs beschrieben; zusätzlich wurden allerdings in vier weiteren Ansätzen mit einem 50fachen Überschuß ($1\text{ }\mu\text{M}$) der vier erwähnten Steroide versucht, das ^3H -Östradiol-17 β aus der Bindung zu verdrängen. Die Kreuzreaktionen wurden an 2 Proben untersucht. Abb. 7 zeigt das Resultat dieses Experiments.

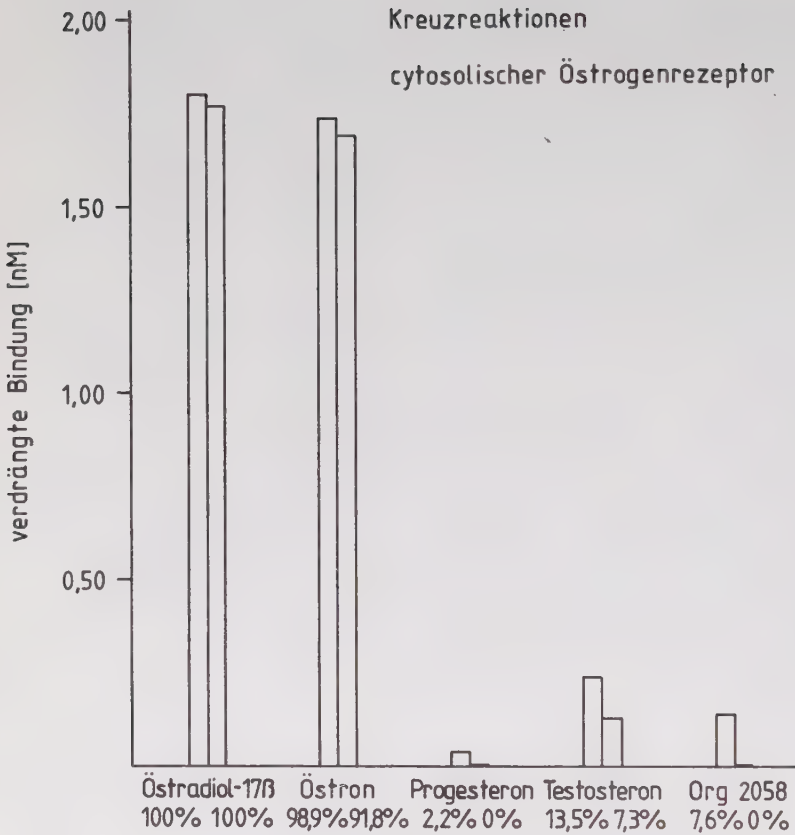


Abb. 7: Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit dem cytosolischen Östrogenrezeptor, bestimmt mit 2 Proben. Der Rezeptor wurde mit 50fachem Überschuß an nicht markiertem Hormon inkubiert. Der Anteil des aus der Bindung verdrängten ^3H -Östradiol-17 β ist für die beiden Proben unter dem jeweiligen Hormon angegeben.

Zuletzt sei noch die Reproduzierbarkeit der Rezeptorbestimmung dargestellt. Insgesamt wurden bei 15 Proben die Bestimmungen wiederholt. In Abb. 8 ist jeweils das Ergebnis der ersten Bestimmung auf die Abszisse und das Ergebnis der zweiten Bestimmung auf die Ordinate aufgetragen. Im Idealfall sollte, bei identischem Ergebnis der Erstbestimmung und der Wiederholung, die Gerade eine Steigung $a = 1$ aufweisen und durch den Ursprung gehen.

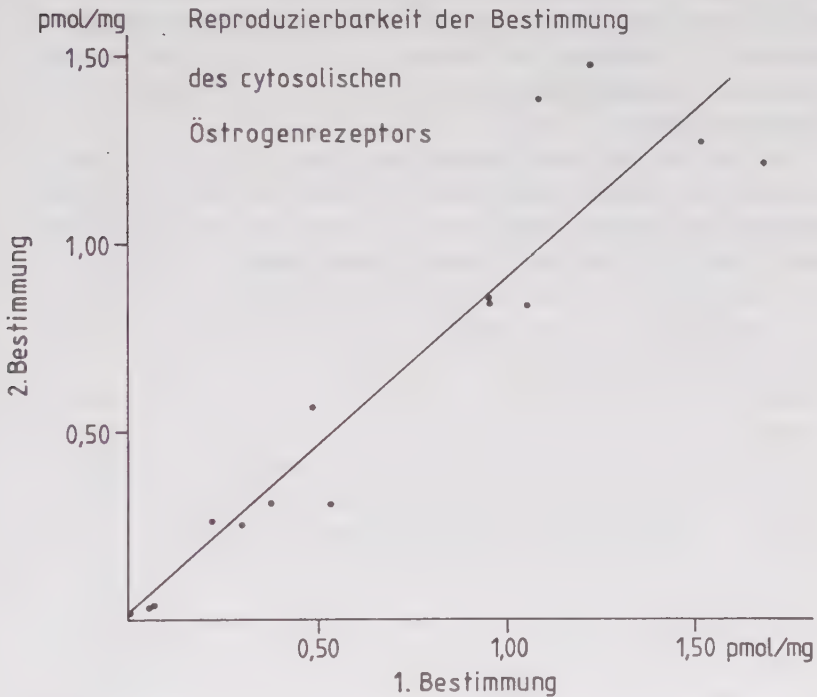


Abb.8: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des cytosolischen Östrogenrezeptors. Auf die Abszisse ist das Resultat der 1. Bestimmung, auf die Ordinate das der 2. Bestimmung aufgetragen. (Angaben in pmol/mg DNA) Steigung $a = 0.8838$; Schnittpunkt mit der y-Achse $b = 0.0222$; $R = 0.9353$; $n = 15$.

4. Bestimmung des Östrogenkernrezeptors

a) Prinzip

Um den Rezeptor zum Nachweis wieder in eine lösliche Form zu überführen, wurde mit Trypsin, einem proteolytischen Enzym, das hormonbindende "Core-Protein" vom Rezeptor abgespalten. Das "Core-Protein" bleibt bei Zentrifugation im Überstand, in dem dann mit einem sog. Exchange-Assay mit anschließender Agargelelektrophorese die Rezeptorkonzentration nachgewiesen wird.

Da es sich bei dem Kernrezeptor immer um die mit Hormon besetzte Form des Rezeptors handelt, muß bei der Inkubation zunächst das endogen vorhandene Östradiol gegen das markierte ausgetauscht werden. Der Rezeptor wurde deshalb mit einer doppelten Konzentration an ^3H -Östradiol-17 β und zusätzlich für 15 min bei 25° C inkubiert.

b) Routinebestimmung

Zur Extraktion des Östrogenkernrezeptors wurden zu der 4,5 ml Suspension des 5 000 rpm-Pellets (s.S.29) 0,5 ml Trypsin-Puffer mit 130 μg Trypsin (Rind, 3.5 U/mg, E.C. 3.4.21.4., Merck) in 1 ml PSD-Puffer (s.S.29) gegeben. Die Suspension enthielt dann 13 μg Trypsin/ml. Das Verhältnis von Trypsinkonzentration zur Konzentration des in der Suspension gelösten Proteins lag dann ungefähr bei 1 : 300. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte über Nacht (ca. 20 h) unter leichtem Schütteln bei 0° C im Kühlraum. Nach der Trypsinbehandlung wurde die Suspension 60 Minuten bei 50 000 rpm (ca. 300 000 g_{av} , Beckman Ultrazentrifuge, Rotor SW 56) zur Erlangung eines partikelfreien Überstandes zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurden in einem Reagenzglas

200 µl einer 100 nM ^3H -Östradiol-17 β -Lösung in 97 % Methanol mit 3 % Glycerin und in einem zweiten Reagenzglas parallel dazu zusätzlich 200 µl 5 µM Östradiol-17 β evaporiert.

Nach vollständigem Verdampfen des Methanols wurden jeweils 0.5 ml des Überstands dazupipettiert.

In der Rezeptorlösung waren jetzt 40 nM ^3H -Östradiol-17 β und in dem Parallelansatz für die NSB zusätzlich 2 µM Östradiol-17 β enthalten.

Dies wurde 15 Minuten bei 25° C im Wasserbad und anschließend 60 Minuten bei 0° C im Eisbad und Kühlraum inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte eine zweimalige Kohlebehandlung: Zu den 0.5 ml Überstand wurden 100 µl 2 %ige Kohlesuspension mit 0.2 % Dextran (MG 60 000 - 90 000) in PSD-Puffer (s.S.29) gegeben. Nach 1 min Schütteln und 4 min Inkubation wurde 10 min bei 3 000 rpm zentrifugiert, vom Überstand 0.5 ml abpipettiert und die Kohlebehandlung wiederholt. Schließlich wurden jeweils 100 µl auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte nach den gleichen Modalitäten wie auf Seite 43 beschrieben. Durch die Trypsinbehandlung wird der Östrogenrezeptor in mehrere verschiedene Fragmente aufgespalten; dadurch kommt es zu einer Veränderung von Ladung und Molekülgröße der Rezeptorfragmente. Daraus resultiert sowohl eine Verbreiterung, als auch eine Verschiebung des Gipfels zur Kathode hin (MEYER 1980).

Auch hier ist der zweite Gipfel im Bereich von cm 5,5 - 6,0 mit noch vorhandenem freien Östradiol zu erklären (s. auch S.45). Abb. 9 zeigt eine Agargelelektrophorese des Östrogenkernrezeptors.

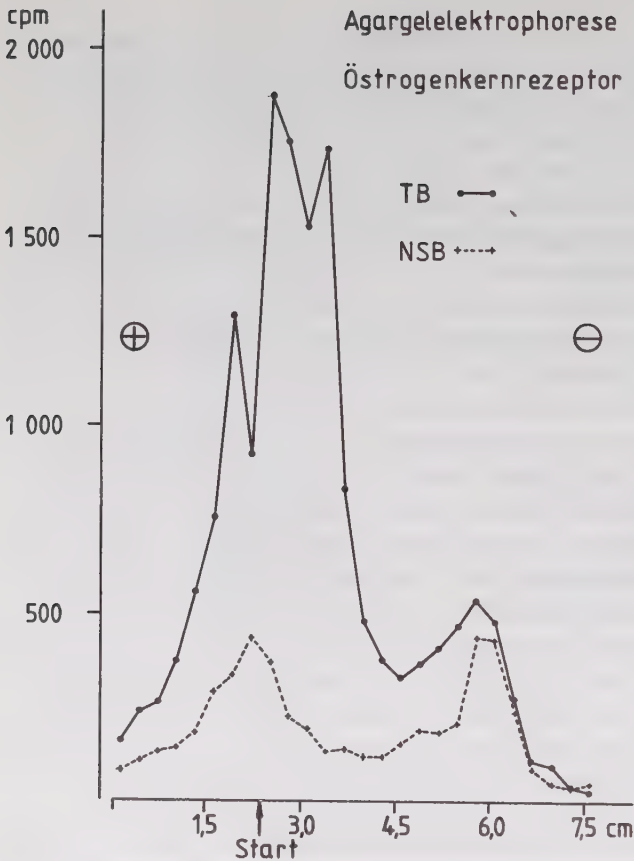


Abb.9: Agargelelektrophorese des Östrogenkernrezeptors

c) Auswertung

Zur Ermittlung der Rezeptorkonzentration wurde die Fläche zwischen den Kurven für TB und NSB unter dem Gipfel bis cm 4,8 berechnet. Es ist nicht bekannt, ob es sich bei der Differenz zwischen TB und NSB im folgenden Bereich auch um Rezeptorfragmente oder um am Anfang der Elektrophorese

dissoziiertes Hormon handelte. Letzteres würde dann allerdings auch Rezeptor repräsentieren. Da nach cm 4.8 die spezifische Bindung relativ gering und der Anteil der NSB sehr hoch war, ging dieser Bereich nicht mehr in die Berechnung der Rezeptorkonzentration mit ein.

Die Umrechnung von cpm in die molare Konzentration erfolgte nach der bereits dargestellten Formel (s. S.31). Es mußte lediglich mit einem anderen Analysenvolumen gerechnet werden, da durch Trypsinzugabe und doppelte Kohlebehandlung die Probe dreimal verdünnt wurde. Von 100 µl der Suspension des 5 000 rpm-Pellets gelangten daher nur noch 62.5 µl in die Elektrophorese.

Auch bei der Bestimmung des Östrogenkernrezeptors war bei allen Proben der NSB-Wert konstant. Er bewegte sich zwischen 1 500 und 2 500 cpm in dem in die Elektrophorese eingesetzten Aliquot. Für die Gesamtbindung ergaben sich Werte bis zu 19 000 cpm. Die Gesamtaktivität lag bei 620 000 cpm/100 µl, die relative Bindung erreichte bei einigen Proben 3.8 %.

d) Validierung

Die Elektrophorese, die beim Östrogenkernrezeptor sowohl zur quantitativen als auch zur qualitativen Bestimmung diente, zeigt die für den Östrogenrezeptor typische Rechtsverschiebung des Gipfels nach Trypsinbehandlung.

Auch für den Kernrezeptor wurden die Kreuzreaktionen mit einigen anderen Steroiden überprüft. Abb. 10 zeigt, daß ein 50facher Überschuß an Progesteron, Testosteron oder Organon 2058 nicht imstande war, ³H-Östradiol-17ß aus der Bindung zu verdrängen. Die Östrogenspezifität scheint beim Kernrezeptor damit noch etwas höher zu sein als beim cytosolischen Rezeptor.

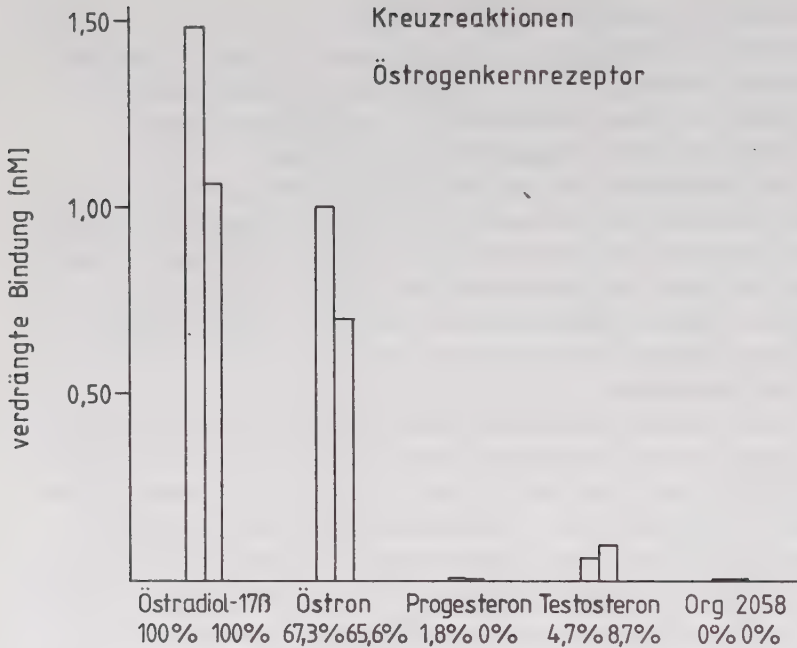


Abb.10: Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit dem Östrogenkernrezeptor, bestimmt mit 2 Proben. Der Rezeptor wurde mit 50fachem Überschuß an nicht markiertem Hormon inkubiert. Der Anteil des aus der Bindung verdrängten ^3H -Östradiol-17 β ist für die beiden Proben unter dem jeweiligen Hormon angegeben.

Die Reproduzierbarkeit der Kernrezeptor-Bestimmung ist in nachstehender Abb. 11 dargestellt. Die Resultate der Erstbestimmung sind gegen die der Wiederholung aufgetragen. Wodurch die weniger zufriedenstellende Reproduzierbarkeit dieser Bestimmung zu erklären ist, ist nicht ganz klar. Vermutlich ist die Variabilität auf wechselnden Homogenisationsgrad und auf Schwankungen bei der Extraktion des Rezeptors mit

Trypsin aus dem Gewebe zurückzuführen. Sicher hat eine eventuell nicht immer gleiche Qualität des Trypsin-Puffers ebenfalls einen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit.

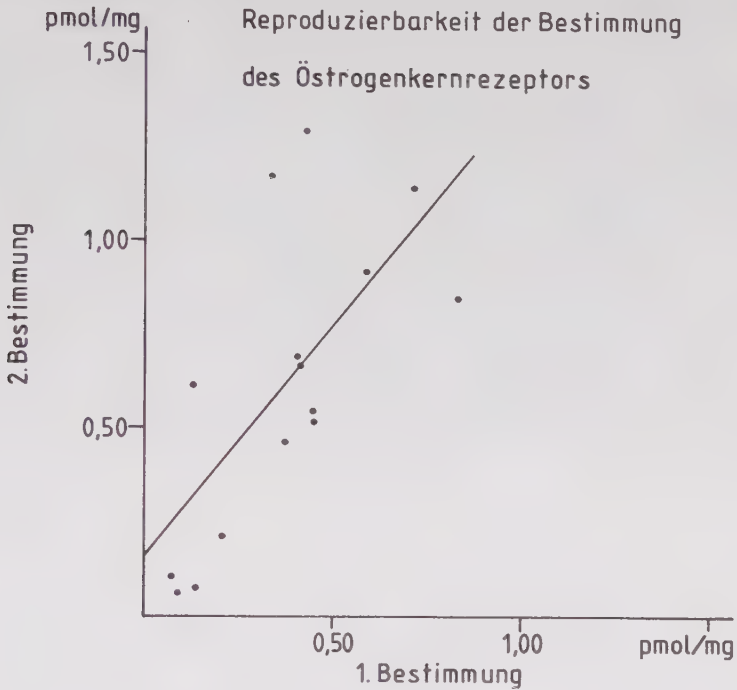


Abb.11: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Östrogenkernrezeptors. Auf die Abszisse ist das Resultat der 1. Bestimmung, auf die Ordinate das der Wiederholung aufgetragen. (Angaben in pmol/mg DNA) Steigung $a = 1.2305$, Schnittpunkt mit der Ordinate $b = 0.1580$, $R = 0.6871$, $n = 15$.

5. Bestimmung des cytosolischen Gestagenrezeptors

a) Prinzip

Die Inkubation zur Bestimmung des cytosolischen Gestagenrezeptors erfolgte analog zu der des cytosolischen Östrogenrezeptors mit sättigenden Hormonkonzentrationen. Als Ligand für den Gestagenrezeptor wurde Organon 2058 verwendet. Es bindet mit hoher Spezifität an den Gestagenrezeptor. Die Dissoziationskonstante liegt in der Größenordnung von 10^{-9} M. Im Gegensatz zu Progesteron oder R 5020 bindet Organon 2058 nicht an CBG (corticosteroid binding globulin) oder an den Glucocorticoidrezeptor (DUFFY 1980; FLEISCHMANN, BEATO 1978; KOENDERS, GEURTS-MOESPOT, BEE, BENRAAD 1979). Die Inkubation wurde mit einer einmaligen Kohlebehandlung beendet und die Aktivität in dem 3 000 rpm-Überstand bestimmt.

b) Routinebestimmung

Für die Bestimmung des cytosolischen Gestagenrezeptors wurden für die Gesamtbindung 200 μ l einer 100 nM 3 H-Organon 2058-Lösung und parallel dazu für den Wert der unspezifischen Bindung zusätzlich zum 3 H-Organon 2058 200 μ l nicht markiertes Organon 2058 in einer Konzentration von 5 μ M evaporiert. Nach Zugabe von 0.5 ml Cytosol waren im Ansatz 40 nM 3 H-Organon 2058 und im Ansatz für die NSB zusätzlich 2 μ M Organon 2058, ein 50facher Überschuß, enthalten.

Danach wurde 2 h 30 min bei 0° C in Eisbad und Kühlraum inkubiert.

Die Inkubation wurde mit einer einmaligen Kohlebehandlung beendet. Dies geschah in der beschriebenen Weise, lediglich wurden zu diesem Ansatz 200 μ l 2 %ige Dextran-Kohle in TEDG-

Puffer (s.S.27) gegeben.

100 μ l-Aliquots des 3 000 rpm-Überstandes wurden schließlich in Szintillationsröhrchen überführt, die Aktivität mit Xylofluor^R extrahiert und bestimmt.

c) Auswertung

Die Auswertung erfolgte wiederum nach der auf Seite 31 angegebenen Formel.

Die spez. Aktivität von ³H-Organon 2058 betrug 51 Ci/mmol. Durch die Verdünnung von 5:7 bei der Kohlebehandlung wurden nur noch 71.4 μ l Analysenvolumen eingesetzt.

Die nicht spezifisch gebundene Aktivität im Überstand nach Kohlebehandlung lag bei 4 000 - 7 000 cpm pro 100 μ l. Die Gesamtbindung betrug bei einigen Proben über 65 000 cpm pro 100 μ l, was einer Rezeptorkonzentration von etwa 15 nM und einer relativen Bindung von 37.5 % entsprach.

d) Validierung

Die Validierung der Bestimmung erfolgte wie beim cytosolischen Östrogenrezeptor durch Scatchard-Analyse, Elektrophorese, Untersuchung von Kreuzreaktionen und der Reproduzierbarkeit.

Die Scatchard-Analyse wurde mit zwei Proben durchgeführt, bei denen ebenfalls hohe Rezeptorkonzentrationen zu erwarten waren. Da sich die K_D des Gestagenrezeptors um 5 nM bewegt, wurde das Cytosol unverdünnt verwendet, um mit der Rezeptorkonzentration in diesem Bereich zu bleiben.

Jeweils 0.5 ml Cytosol wurden mit 10 verschiedenen Konzentrationen an ³H-Organon 2058 von 20 nM bis 0.52 nM (in 2:3 Verdünnungsschritten) 2h 30 min bei 0° C inkubiert.

Da die Menge an Cytosol begrenzt war, konnte zur Bestim-

mung der NSB kein Parallelansatz mit kaltem Hormon inkubiert werden und es mußte auf eine andere Methode zur Ermittlung der NSB zurückgegriffen werden.

Zur Beendigung der Inkubation wurden aus dem Ansatz 3 mal 2 Aliquots zu 50 µl entnommen, die zur Ermittlung der Gesamtaktivität, der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung unterschiedlich weiterbehandelt wurden.

Die Aliquots für die Messung der Gesamtaktivität wurden direkt in ein Szintillationsröhrchen übertragen, 1 ml Aqua bidest. und 3 ml Xylofluor^R zugegeben.

Zur Bestimmung der Gesamtbindung wurde eine Kohlebehandlung wie folgt durchgeführt: Zu dem 50 µl-Aliquot werden zunächst 0,5 ml eines Phosphat-Gelatine-Albumin-Puffers (20 mM KH_2PO_4 , 47 mM Na_3PO_4 , pH 7.2, 0.1% Gelatine, 0.14 % Albumin und 5.4 mM NaN_3) und anschließend 0.5 ml 0.4 %ige Kohlesuspension mit 0,4 % Dextran (MG 60 000 - 90 000) in Aqua bidest. gegeben. Nach 1 min Schütteln und 4 min Inkubation wurde 10 min bei 3 000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0.7 ml abpipettiert, mit 0.3 ml Wasser und 3 ml Xylofluor^R in die Zählröhrchen gegeben und die Aktivität bestimmt.

Die unspezifische Bindung wurde wie die Gesamtbindung bestimmt. Vor der Kohlebehandlung wurden diese Aliquots allerdings für 10 min auf 65° C in einem Wasserbad erhitzt, was zu einer Zerstörung des Rezeptors führen sollte. Das Ergebnis der Scatchard-Analyse zeigt Abb. 12.

In die Elektrophorese, die im übrigen genauso durchgeführt wurde wie beim Östrogenrezeptor, wurden bei mehreren Proben 100 µl des Überstandes nach der Kohlebehandlung (s. Routinebestimmung) eingesetzt. Abb. 13 zeigt ein Beispiel für eine solche Elektrophorese. Unter den vorliegenden Bedingungen wanderte der Gestagenrezeptor wie der Östrogenrezeptor einige mm in Richtung der Anode. Meist bildete sich bei cm 5.0 - 5.7 noch ein zweiter Gipfel aus mit wechselnder Höhe, zuweilen sogar gleich groß wie der erste. Die Qualität dieses

zweiten Gipfels ist noch nicht geklärt. Es scheint sich dabei aber auch um ein Fragment des Rezeptors zu handeln. Das Ausmaß dieses zweiten Gipfels hing in gewissem Maße davon ab, inwieweit die Kühlkette konsequent aufrecht erhalten wurde, insbesondere in der in dieser Hinsicht kritischen Phase der Kohlebehandlung und des Auftragens der Probe auf das Gel, und wie schnell diese Schritte durchgeführt wurden.

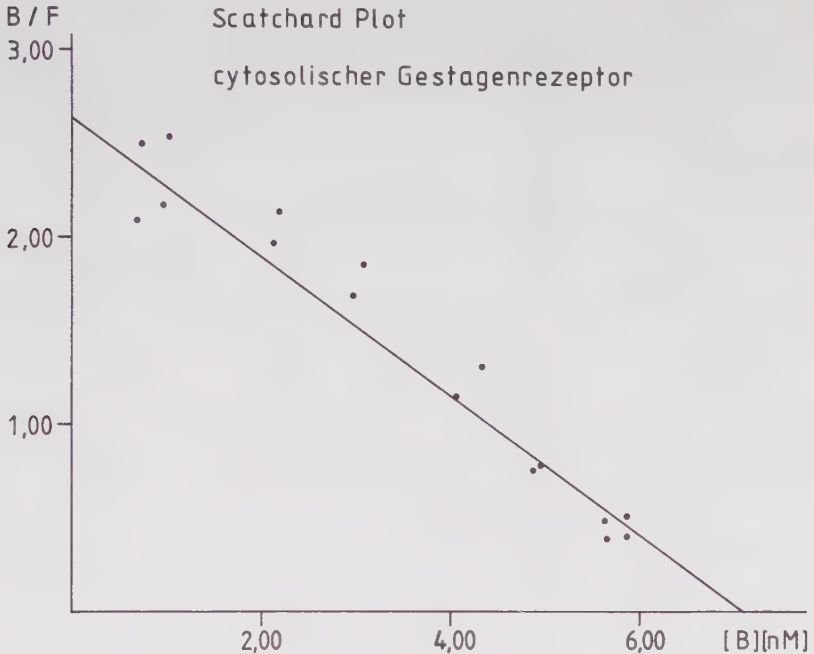


Abb.12: Scatchard Plot des cytosolischen Gestagenrezeptors. $K_D = 2.58 \text{ nM}$; $B_{\max} = 7.12 \text{ nM}$; $R^2 = 0.9454$; Rezeptorkonzentration in der Routinebestimmung: 8.15 nM .

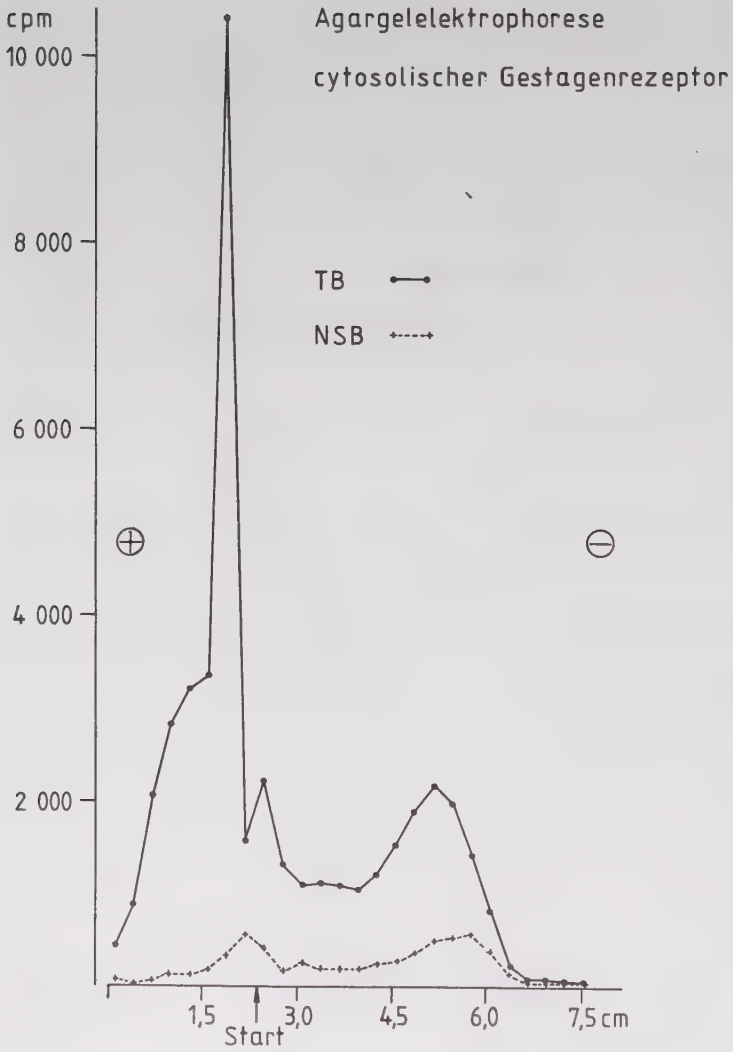


Abb.13: Agargelelektrophorese des cytosolischen Gestagenrezeptors.

Auch die Kreuzreaktionen wurden für den Gestagenrezeptor in der bereits beschriebenen Weise untersucht. Dabei wurden die Cytosole wie bei der Routinebestimmung mit 40 nM ^3H -Organon 2058 und jeweils mit einem 50fachen Überschuß (2 μM) an kaltem Organon 2058, Progesteron, Östradiol-17 β , Östron und Testosteron inkubiert. In Abb. 14 sind die Kreuzreaktionen dargestellt.

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmung des cytosolischen Gestagenrezeptors ist in Abb. 15 zu sehen. Die Darstellung erfolgte in gleicher Weise wie bei den bereits beschriebenen Rezeptorbestimmungen.

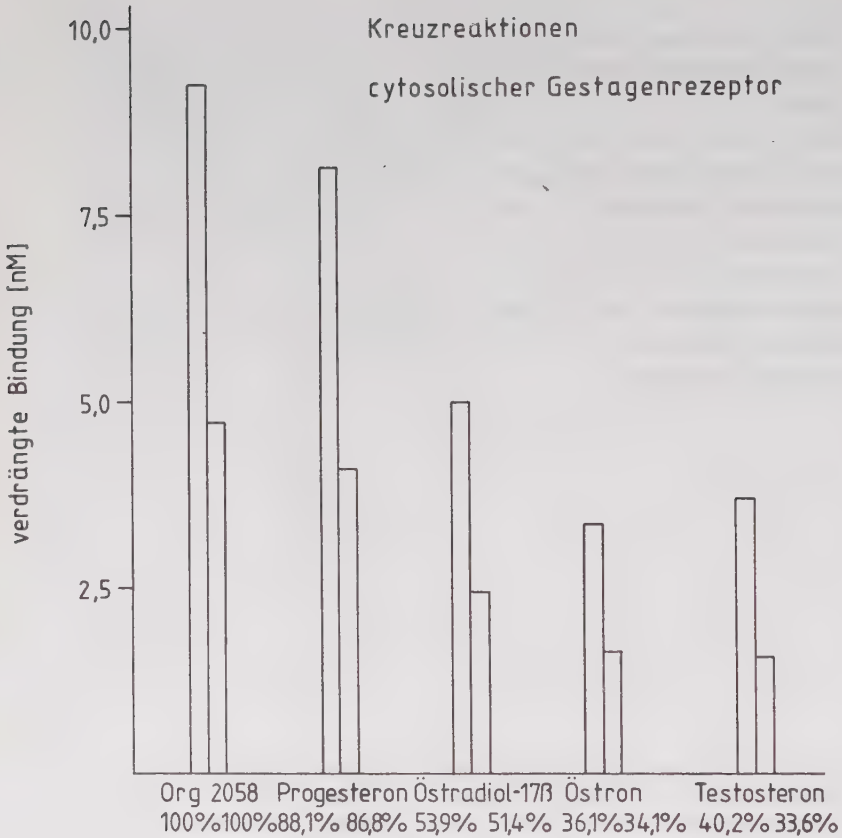


Abb.14: Kreuzreaktionen verschiedener Steroide mit dem cytosolischen Gestagenrezeptor, bestimmt mit 2 Proben. Der Rezeptor wurde mit 50fachem Überschuß an nicht markiertem Steroid inkubiert. Der Anteil des aus der Bindungsverdrängten ^3H -Organon 2058 ist für die beiden Proben unter dem jeweiligen Hormon angegeben.

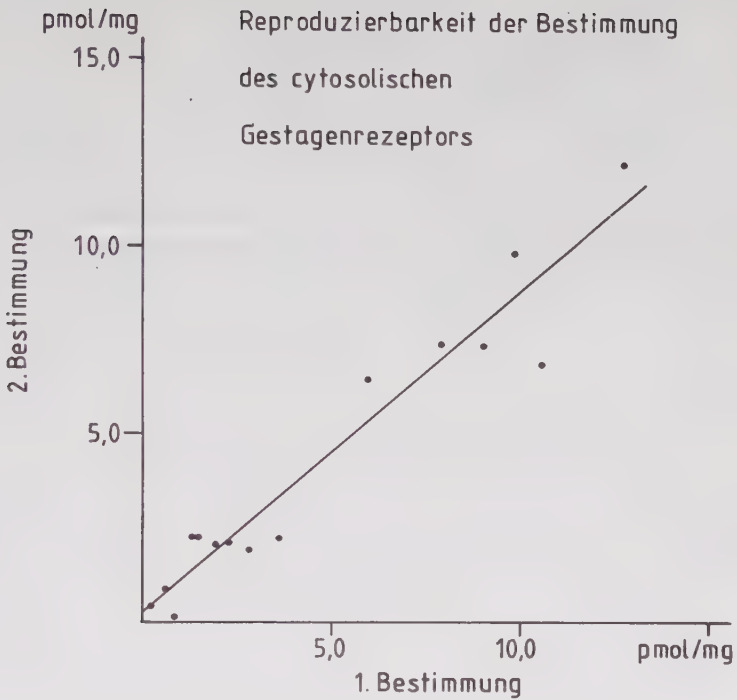


Abb.15: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des cytosolischen Gestagenrezeptors. Auf die Abszisse ist das Resultat der 1. Bestimmung, auf die Ordinate ist das der Wiederholung aufgetragen. (Angaben in pmol/mg DNA) Steigung $a = 0.8546$, Schnittpunkt mit der Ordinate $b = 0.2847$, $R = 0.9636$, $n = 15$.

C Bezugsgrößen

1. Proteinbestimmungen

a) Biuret-Methode

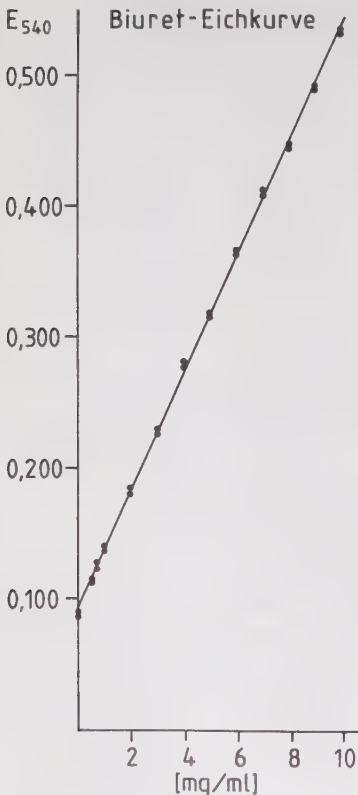


Abb.16: Biuret-Eichkurve

Als Bezugsgröße für den Oxytocinrezeptor wurde die Proteinkonzentration in der Suspension des 40 000 rpm-Pellets gewählt. Sie wurde mit der Biuret-Methode (WATTERS 1978; PELLELY, GARNER, LITTLE 1978), die sich auch zur Bestimmung nicht löslicher Proteine eignet, ermittelt. Das Pellet wurde in 10 mM Tris-HCL-Puffer suspendiert, für die Eichkurve wurde bovines Serumalbumin (Serva) in einer Konzentration von 0.5-10 mg/ml in ebenfalls 10 mM Tris-HCL, pH 7.6, gelöst. Da Tris einen gewissen Einfluß auf die Farbbildung des Biuret-Reagenz hat, ist eine identische Konzentration des Puffersalzes in Probe und Standard wichtig. Die Proteinbestimmung erfolgte auf Mikrotitrationsplatten (Nunc). Zu 70 μ l Probe wurden 280 μ l Biuret-Reagenz gegeben.

Das Reagenz hat folgende Zusammensetzung:

1.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

4.9 g Na_2 -Tartrat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

7.5 g NaOH

werden mit Aqua bidest. zu einem Liter Reagenz aufgefüllt (WATTERS 1978).

Nach kurzem Schütteln wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend mit einem Mikrotitrationsplatten-Photometer (Flow) bei einer Wellenlänge von 540 nm die Extinktion gemessen. Abb. 16 zeigt eine Eichkurve.

b) Bromphenolblau-Methode

Für die Bestimmung des cytosolischen Proteins war die Biuret-Methode ungeeignet, da das in den Cytosolen enthaltene DTT auch bei größerer Verdünnung mit Farbreagenz einen sehr starken und nicht kalkulierbaren Einfluß auf die Farbbildung hatte. Da es sich bei den cytosolischen Proteinen um lösliche Proteine handelte, konnte auf die Bromphenolblau-Methode (FLORES 1978) zurückgegriffen werden. Diese Proteinbestimmung wurde in gleicher Weise wie die Biuret-Bestimmung in einem Pipettierschritt auf Mikrotitrationsplatten durchgeführt. Da die Empfindlichkeit dieser Methode eine Größenordnung über der der Biuret-Methode liegt und der Variation von Proben- und Reagenzvolumen durch das maximale Fassungsvermögen der Löcher in den Mikrotitrationsplatten von 400 μl Grenzen gesetzt waren, mußten Proben und Standard 1 : 10 vorverdünnt werden.

Der Standard wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.5 - 20 mg/ml BSA in TEDG - Puffer hergestellt.

Das Bromphenolblau-Reagenz setzt sich wie folgt zusammen:

75 mg Bromphenolblau

50 ml Äthanol

25 ml Eisessig

500 µl Tween 80

werden ad 1 l mit Aqua bidest. aufgefüllt.

In die Bestimmung wurden 30 µl Probe bzw. Standard und 300 µl Farbreagenz eingesetzt und nach kurzem Schütteln der Platte die Extinktion bei 610 nm sofort gemessen.

Abb. 17 zeigt eine Eichkurve und deren Parallelverschiebung nach oben, wenn zu jedem Eichpunkt die gleiche Menge einer unbekannten Probe gegeben wird. Die Differenz zwischen den beiden Eichkurven entspricht der Konzentration dieser Probe. Tab. 3 erläutert die Daten für die Parallelverschiebung der Eichkurve bei Probenzugabe genauer.

Tab.3

Bromphenolblau-Proteinbestimmung

Vergleich der Eichkurven mit und ohne Probenzusatz (s. Abb. 17)

Eichkurve	Steigung	R ²
E3	0.0444	0.9975
E2	0.0453	0.9978
E1	0.0435	0.9911

Die Konzentration der unverdünnten Probe beträgt 6.6 mg/ml, die Differenz von E2 - E1 (Zusatz d. 1:4 verd.Probe) 1.6 mg/ml und die Differenz von E3 - E1 (Zusatz d. 1:2 verd. Probe) 3.3 mg/ml.

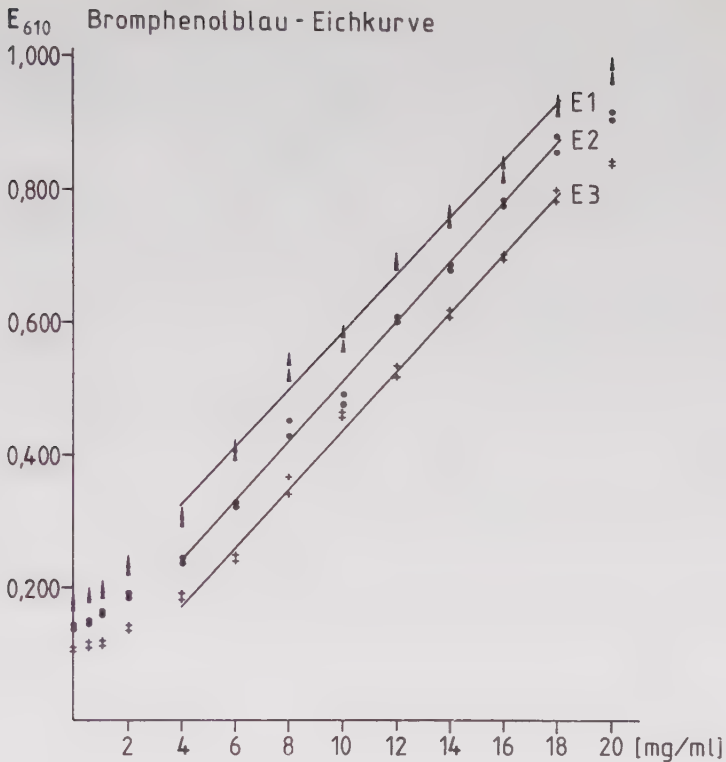


Abb.17: Bromphenolblau-Eichkurve (E3). Parallelverschiebung der Eichkurve nach oben, wenn zu den Eichpunkten eine 1 : 4 (E2) bzw. eine 1 : 2 (E1) verdünnte Probe gegeben wird. (s. auch Tab.3)

2. DNA - Bestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in den Homogenaten wurde nach einer von LABARCA und PAIGEN 1980 beschriebenen Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer Verstärkung der Fluoreszenz von DNA, nachdem das Reagenz Hoechst

33258, ein Bisbenzimidazol, an die DNA gebunden wurde.

Von der Suspension des 5 000 rpm-Pellets (s.S.29) wurde ein Aliquot von 5.0 ml zur Bestimmung der DNA-Konzentration aufbewahrt. Zu diesem Aliquot wurden 5 ml eines Kochsalz-Phosphat-Puffers, 4 M NaCl, 90 mM Na_3PO_4 , pH 7.4, 4 mM EDTA gegeben, so daß die Suspension eine NaCl-Konzentration von 2 M aufwies. EDTA sollte die DNA vor einem Abbau durch evtl. vorhandene DNAase schützen. Durch die konzentrierte Kochsalz-Lösung wurde zusammen mit einer anschließenden Ultraschall-Behandlung die DNA in Lösung gebracht. Die Suspensionen wurden dazu zweimal 10 s mit maximaler Amplitude mit einem Ultraschallhomogenisator (MSE) beschallt und dazwischen, um eine Erwärmung der Proben zu verhindern, für einige Minuten in ein Eisbad gestellt. Zur Bestimmung wurde die Suspension nun noch 1 : 50 mit einem 2 M NaCl Puffer (2M NaCl, 50 mM Na_3PO_4 , pH 7.4) vorverdünnt. Als Standard wurde Kälberthymus-DNA (Calbiochem-Behring) in einer Konzentration von 250 µg/ml in einem 50 mM Na_3PO_4 -Puffer, pH 7.4, mit 2 M NaCl und 2 mM EDTA hergestellt und bei - 20° C eingefroren. Vor der Bestimmung wurde diese Stammlösung 1 : 4 vorverdünnt und dann in neun 2:3-Verdünnungsschritten eine Eichkurve erstellt. Die Eichpunkte haben dann eine DNA-Konzentration von 1.1 µg/ml bis 41.7 µg/ml.

Zur fluorimetrischen Messung wurden 200 µl der Eichkurvenpunkte bzw. 200 µl der verdünnten Probe in Polyacrylat-Einmalkuvetten (Sarstedt) pipettiert, 1.8 ml des Farbreagens Hoechst 33258 in einer Konzentration von 2 µg/ml in 2 M NaCl, 50 mM Na_3PO_4 -Puffer, pH 7.4, zugegeben und die Proben nach kurzem Schütteln sofort an einem Fluoreszenz-Spectrophotometer (Perkin-Elmer) gemessen.

Das an die DNA gebundene Reagenz wird bei einer Wellenlänge von 356 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 492 nm.

Abb. 18 zeigt eine Eichkurve der DNA-Bestimmung.

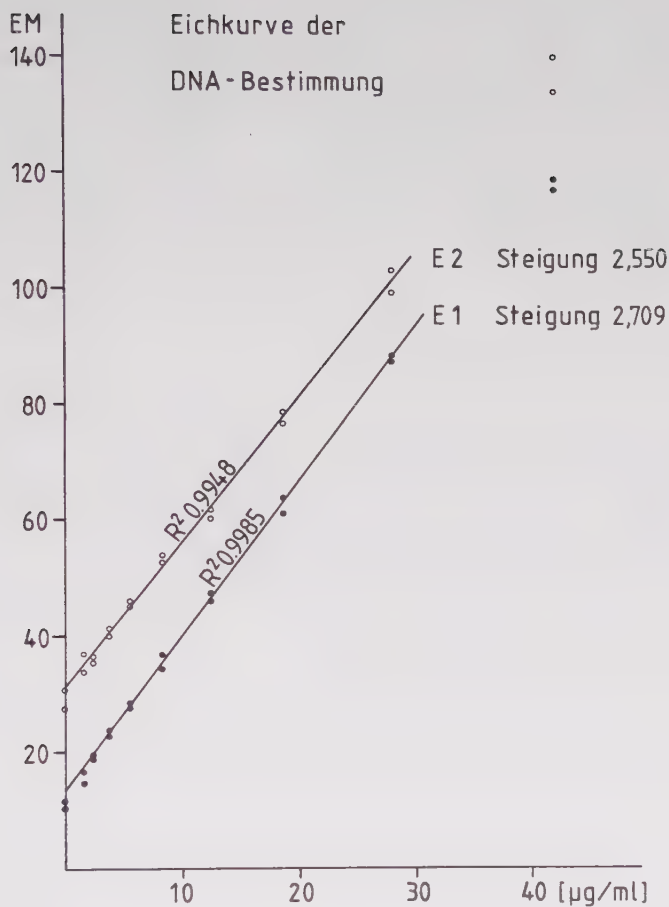


Abb.18: Eichkurve der DNA-Bestimmung. Zu 200 µl Standard wurden 100 µl Puffer (E1) bzw. 100 µl einer Probe (E2) gegeben. Die Konzentration der Probe beträgt 12.9 µg/ml. Die Differenz zwischen E1 und E2 beträgt 5.8 µg/ml (Mittelwert, berechnet im Meßbereich von 0 - 30 µg/ml).

Zu allen Eichpunkten wurden jeweils 100 µl einer unbekannten Probe gegeben. Die Eichkurve wird dadurch parallel nach oben verschoben, die Differenz zwischen den Eichkurven entspricht der DNA-Konzentration in dieser Probe.

Da die Probe insgesamt 1 : 100 verdünnt wurde, muß die gemessene Konzentration noch mit 100 multipliziert werden, um die DNA-Konzentration, die der Suspension des 5 000 rpm-Pellets bzw. des daraus gewonnenen Cytosols entspricht, zu erhalten.

3. Naßgewicht

Als weitere Bezugsgröße wurde das Naßgewicht der Proben bestimmt. Die Homogenate wurden während des Auftauens im Kühlraum gewogen, wenn die Temperaturdifferenz zwischen Zentrifugenröhrchen und Luft sich weitgehend ausgeglichen hatte und sich kein Kondenswasser mehr niederschlug.

Das Gewicht der leeren Röhrchen war bereits vor der Homogenisation genau bestimmt worden.

D Bestimmungen von Ocytocin, LH und Progesteron

Für die Bestimmung der peripheren Plasmakonzentrationen von Ocytocin und Progesteron wurden aus der V.jugularis oder aus V. oder A.caudalis mediana etwa 10 ml Blut entnommen und in Zentrifugenröhrchen verbracht, die zur Gerinnungshemmung bereits 200 µl eines Prostaglandinstabilisators (0.3 M EDTA, 1 % Acetylsalicylsäure in Aqua bidest.) enthielten. Die Blutproben wurden etwa 5 min in einem Eisbad gekühlt und anschließend 20 min bei 3 000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei

+ 4° C zentrifugiert. Die so gewonnenen Plasmaproben wurden bei - 20° C gelagert.

Die Hormonbestimmungen wurden im Labor von Prof. Dr. Schams mit Radio-Immun-Tests durchgeführt. Die Ocytocinbestimmung im Plasma erfolgte wie von SCHAMS 1983 beschrieben, die LH-Bestimmung wurde von SCHAMS und KARG 1969 publiziert. Die Progesteronbestimmung erfolgte mit einer modifizierten, von HOFFMANN, KYREIN und ENDER 1973 beschriebenen Methode. Progesteron wurde dabei nicht, wie dort dargelegt, aus dem Plasma extrahiert, sondern das Plasma direkt in den RIA eingesetzt.

E r g e b n i s s e

A Ocytocinrezeptor

1. Konzentrationsverlauf im Zyklus

Schon bei den ersten Untersuchungen von Proben, deren Zyklusstand nur durch die Beurteilung der Ovarien, des Uterus und des Plasmaprogesteronspiegels abgeschätzt werden konnte, ergab sich für den Konzentrationsverlauf des Ocytocinrezeptors im Zyklus eine klare Tendenz. Die höchsten Konzentrationen, bezogen auf den Proteingehalt in der Rezeptorfraktion, wurden zum Zeitpunkt der Brunst, also vor der Ovulation, gefunden. Die erhaltenen Daten sind in nachstehender Tabelle (Tab. 4) und Abbildung (Abb. 19) dargestellt.

Tab. 4

Konzentration des Ocytocinrezeptors im Endometrium des Rindes während des Zyklus.

Angaben in pmol/mg Protein $\pm$ Standardabweichung.

Zyklustag	Rezeptorkonzentration	Anzahl der Proben
1 - 2	0.86 $\pm$ 0.42	8
3 - 7	0.41 $\pm$ 0.21	13
8 - 17	0.03 $\pm$ 0.07	35
18 - 19	0.54 $\pm$ 0.45	14
20 - 21	1.69 $\pm$ 0.97	8
		ges. 78

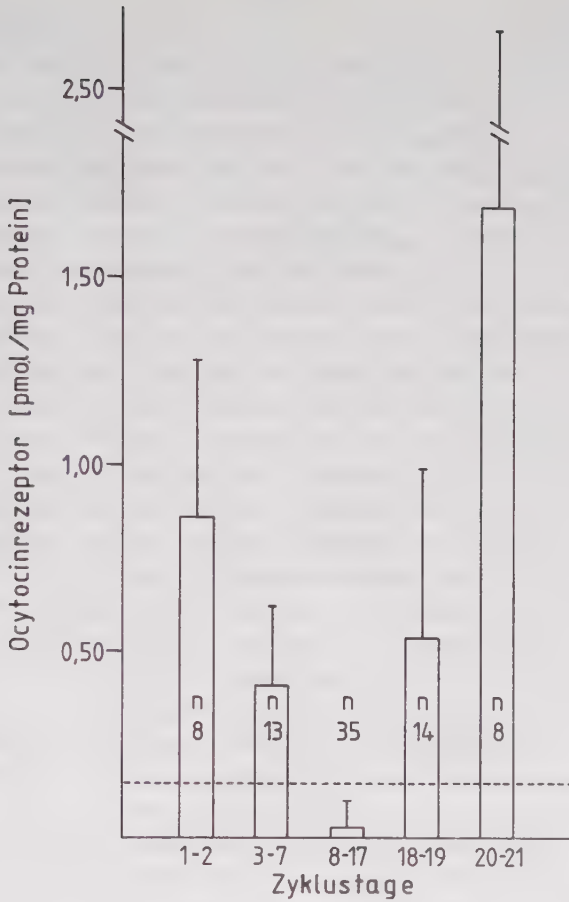


Abb.19: Konzentrationen des Oxytocinrezeptors während des Zyklus in pmol/mg Protein $\pm$ Standardabweichung.

Die relativ großen Standardabweichungen sind wohl zum Teil aus starken individuellen Schwankungen in der Rezeptorausstattung zu erklären. Hauptsächlich muß dafür aber die Zusammenfassung von jeweils zwei Zyklustagen im Brunstzeit-

raum verantwortlich gemacht werden. Da die Dauer der Rezeptorsynthese sich in der Größenordnung von Stunden bewegt (SOLOFF 1975b; LEAVITT 1985), werden kürzerfristige Veränderungen in der Rezeptorkonzentration damit kaschiert. Dies zeigt auch die Verlaufskurve, die von Endometriumpuben mit genau definiertem Zyklusstand ermittelt wurde. In Abb. 20 ist der Verlauf des Ocytocinrezeptors im Endometrium von 28 Kalbinnen, die einige Wochen vor der Schlachtung beobachtet werden konnten und an definierten Zyklustagen geschlachtet wurden, dargestellt. Wenn auch die Anzahl der untersuchten Proben klein ist, so ist doch ersichtlich, daß zu einer genauen Charakterisierung des Verlaufs eine Zusammenfassung von Zyklustagen um die Brunst (Tag 16 - Tag 7) nicht sinnvoll erscheint. Bei dieser zweiten Serie von Proben bestätigt sich, daß die Ocytocinrezeptorkonzentration ihr Maximum am Tag vor der Ovulation erreicht. In Abb. 20 ist zusätzlich noch der Verlauf der entsprechenden Plasmaprogesteron-Konzentrationen dargestellt. Diese verhalten sich reziprok zum Verlauf der Konzentrationen des Ocytocinrezeptors. Allerdings scheint ein geringfügiger Anstieg der Rezeptorkonzentration schon vor der am Plasmaprogesteron erkennbaren Luteolyse stattzufinden. Die für die Tage 15 - 17 ermittelten Daten liegen aber an der bereits diskutierten Meßbereichsgrenze und sind daher mit Vorsicht zu interpretieren.

Die bei den zahlreichen Scatchard-Analysen ermittelte Dissoziationskonstante betrug im Mittelwert 1.83 ± 0.59 nM ($n = 52$). Eine Abhängigkeit vom Zyklusstand war nicht erkennbar. Die relativ große Streubreite der Werte dürfte testbedingt sein.

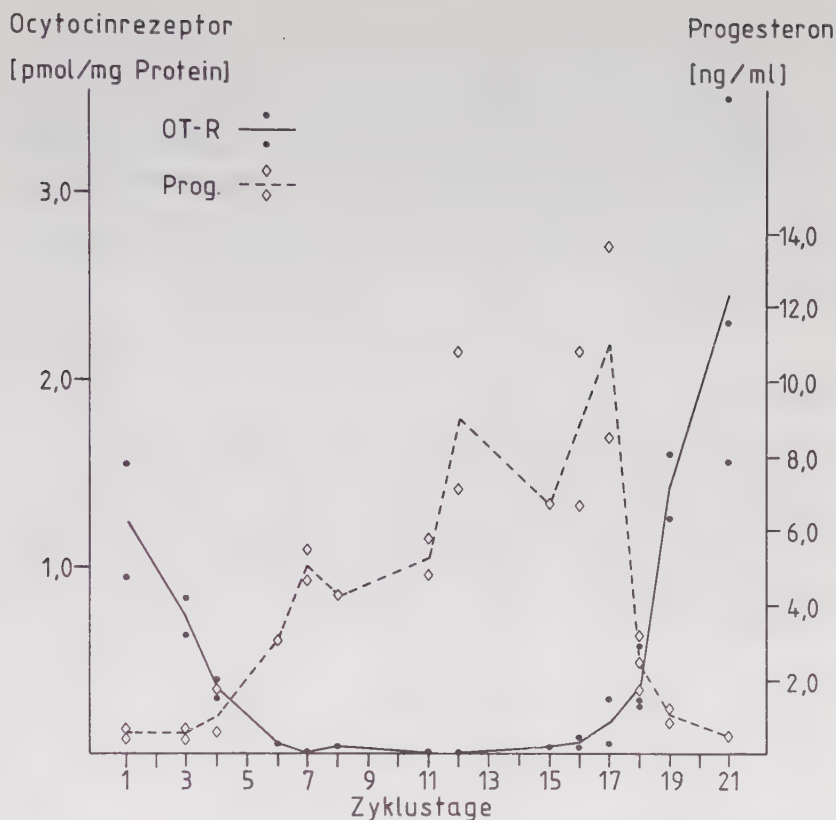


Abb.20: Konzentrationen des Oxytocinrezeptors (OT-R) und des Plasmaprogestérons (Prog.) an den jeweiligen Schlachttagen.

2. Einfluß einer Oxytocindauerinfusion

Eine zweitägige Oxytocindauerinfusion scheint die Konzentration des Oxytocinrezeptors im Endometrium nicht deutlich absenken zu können. Dies ist das Resultat des eingangs beschriebenen Infusionsversuchs. Bei zwei Kalbinnen wurde mit der Infusion zwei Tage vor der Brunst, bei einer Kalbin am

Tag der Brunst begonnen. Sie erhielten 12 µg Ocytocin pro 100 kg Körpergewicht und Tag. Die Infusion wurde 48 Stunden durchgeführt, die Schlachtung erfolgte etwa eine Stunde nach dem Absetzen der Infusion. Die erreichten Plasmaocyto-
cinspiegel sind Tab. 5 zu entnehmen, die Rezeptorkonzentrationen der Infusionstiere im Vergleich zu ebenfalls an diesen Zyklustagen geschlachteten Kontrolltieren sind in Tab. 6 aufgezeigt.

Tab. 5

Plasmaocyto-
cinspiegel während der 48-stündigen Ocytocin-
dauerinfusion. In beide Vv. jugulares waren Katheder gelegt worden, wobei über einen die Ocytocinlösung infundiert wurde und aus dem jeweils kontralateralen die Blutproben entnommen wurden. Die Proben wurden in sechsständigem Intervall entnommen.

Kalbin	Plasmaocyto- cinspiegel [pg/ml]		
	11	12	13
	40.6	32.9	10.9
	16.6	29.0	23.8
	46.1	24.3	19.7
	32.8	57.0	57.0
	22.8	10.7	16.6
		27.1	21.6
	21.7		21.5
	23.7	18.6	17.7
	24.2	15.6	16.9

Tab. 6

Konzentrationen des Ocytocinrezeptors im Brunstzeitraum nach Ocytocindauerinfusion und bei Kontrolltieren.

Zyklustag	[OT-Rezeptor] [fmol/mg Protein]	K _D [nM]	$\bar{x}$ [fmol/mg]
Infusions-Tiere			
21 (Nr. 12)	1986	1.35	
21 (Nr. 13)	1408	1.38	
2 (Nr. 11)	660	1.27	
Kontrolltiere			
19	1258	1.95	
19	1610	1.34	1434
21	1576	1.74	
21	3499	3.02	2465
21	2320	1.54	
1	1556	1.95	
1	950	1.30	1253
3	830	2.94	
3	634	2.04	732

3. Bestimmung in Eileiter und Ovar des Rindes und im Endometrium des Schweines.

Außer im Endometrium wurde auch versucht, in Eileiter und Ovar des Rindes und im Endometrium des Schweines Ocytocin-

rezeptoren nachzuweisen.

5 Eileiter von an den Tagen 19, 21, 21, 2 und 4 geschlachteten Kalbinnen und 5 Corpora lutea, verteilt auf die gesamte Lutealphase, wurden in diesem Zusammenhang untersucht. In keiner dieser Proben konnte eindeutig mit der hier beschriebenen Methode Ocytocinrezeptor nachgewiesen werden. In einigen Proben war zwar minimale spezifische Bindung vorhanden, bei der Scatchard-Analyse ergab sich jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen den Punkten.

Ein ähnliches Resultat erbrachte die Untersuchung von 6 Schweineendometriumpuben. Jeweils 2 dieser Proben stammten von Tieren, die an den Zyklustagen 10 und 16 und zur Rausche geschlachtet wurden. Während in den Proben vom Tag 10 und der Rausche keine spezifische Bindung gefunden wurde, deutete sich in den beiden am Tag 16 gewonnenen Proben geringe spezifische Bindung an. Die Scatchard-Analysen mit einem R^2 etwas über 0.6 ergaben Rezeptorkonzentrationen in der Größenordnung von 40 - 60 fmol/mg Protein. Die gefundenen Daten liegen aber an der Meßbereichsgrenze und müssen vorsichtig interpretiert werden. Untersuchungen mit einer größeren Probenanzahl und eventuell modifizierter Methode wären notwendig, um diese Daten abzusichern.

B Östrogenrezeptor

Die Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors und des Östrogenkernrezeptors wurden nur bei den 33 Kalbinnen bestimmt, die nach vorheriger Zyklusbeobachtung zu genau definierten Zyklusstadien geschlachtet wurden. Die 3 Tiere des Infusionsversuchs und zwei Tiere, die künstlich besamt worden waren und deren Zyklusstand bei der Schlachtung unklar war, wurden in die Betrachtung des Verlaufs im Zyklus nicht einbe-

zogen.

Abb. 21 zeigt den Verlauf des cytosolischen Östrogenrezeptors.

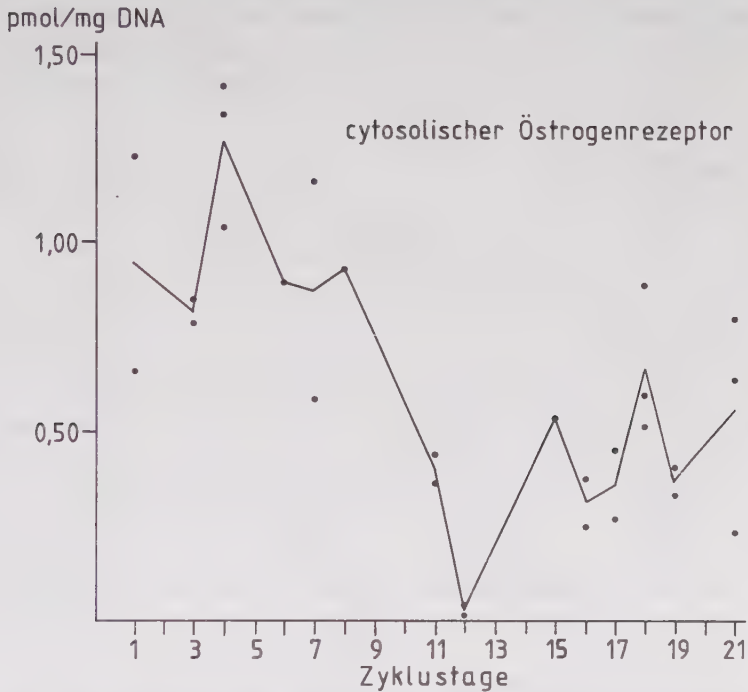


Abb.21: Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors im Zyklusverlauf.

Für den cytosolischen Östrogenrezeptor ergab sich ein Maximum am Tag 4 des Zyklus. Bei den drei Kalbinnen, die an diesem Tag geschlachtet wurden, lag die Konzentration bei 1.45, 1.35 und 1.06 pmol/mg DNA. Die Rezeptorkonzentration war jedoch im ersten Drittel des Zyklus, von Tag 1 - 8, auf sehr hohem Niveau, so daß angesichts der geringen Anzahl der

untersuchten Proben nicht von einem deutlichen Gipfel gesprochen werden kann. Zur Zyklusmitte hin kommt es dann aber zu einem Abfall der Rezeptorkonzentrationen und am Tag 12 konnte schließlich keine spezifische Bindung mehr gemessen werden. Danach stiegen die Rezeptorkonzentrationen zur Brunst hin wieder langsam an.

In Abb. 22 ist der Verlauf des Östrogenkernrezeptors dargestellt.

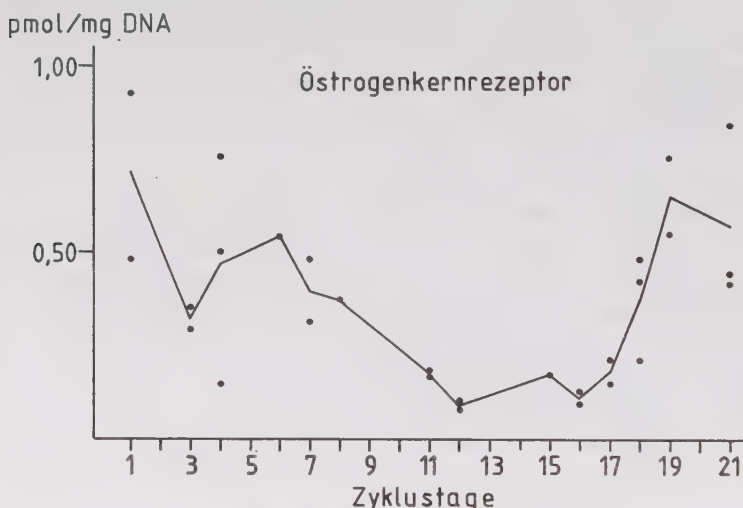


Abb.22: Konzentrationen des Östrogenkernrezeptors im Zyklusverlauf.

Aus ihr ist ersichtlich, daß sich der Verlauf des Kernrezeptors grundsätzlich gleich verhält, lediglich die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Stadien sind weniger ausgeprägt. Das Ansteigen des Rezeptorniveaus am Ende des Zyklus erfolgt beim Kernrezeptor später, aber schneller, als beim cytosolischen Rezeptor. Dies ist durch den entsprechenden Anstieg des Östradiolspiegels im Plasma

zu erklären (POPE 1982). Die Konzentration des Östrogenkernrezeptors beträgt im ersten Drittel des Zyklus nur etwa die Hälfte der Konzentration des cytosolischen Rezeptors. Annähernd gleiche bzw. geringfügig höhere Konzentrationen des Kernrezeptors sind während des Proöstrus und des Östrus zu messen.

C Gestagenrezeptor

Auch die Konzentrationen des cytosolischen Gestagenrezeptors verhalten sich im Verlauf grundsätzlich gleich zu denen des cytosolischen Östrogenrezeptors. Die Konzentrationen liegen allerdings beim etwa 10fachen der Konzentrationen des Östrogenrezeptors. Auch beim Gestagenrezeptor sind die Konzentrationen am Anfang des Zyklus allgemein hoch und ein deutlicher Gipfel für einen bestimmten Zyklustag ist nur schwer festzulegen. Die aus Abb. 23 ersichtlichen Daten lassen aber eine leichte Rechtsverschiebung des Maximums im Vergleich zum cytosolischen Östrogenrezeptor zu den Tagen 6 - 7 hin erkennen. Die Konzentrationen betragen am Tag 6 9.86 pmol/mg DNA, am Tag 7 7.26 und 7.95 pmol/mg DNA und am Tag 8 8.73 pmol/mg DNA. Danach fällt auch die Konzentration des Gestagenrezeptors auf sehr niedrige Werte zur Zyklusmitte hin ab und steigt schließlich zur Brunst wieder langsam an.

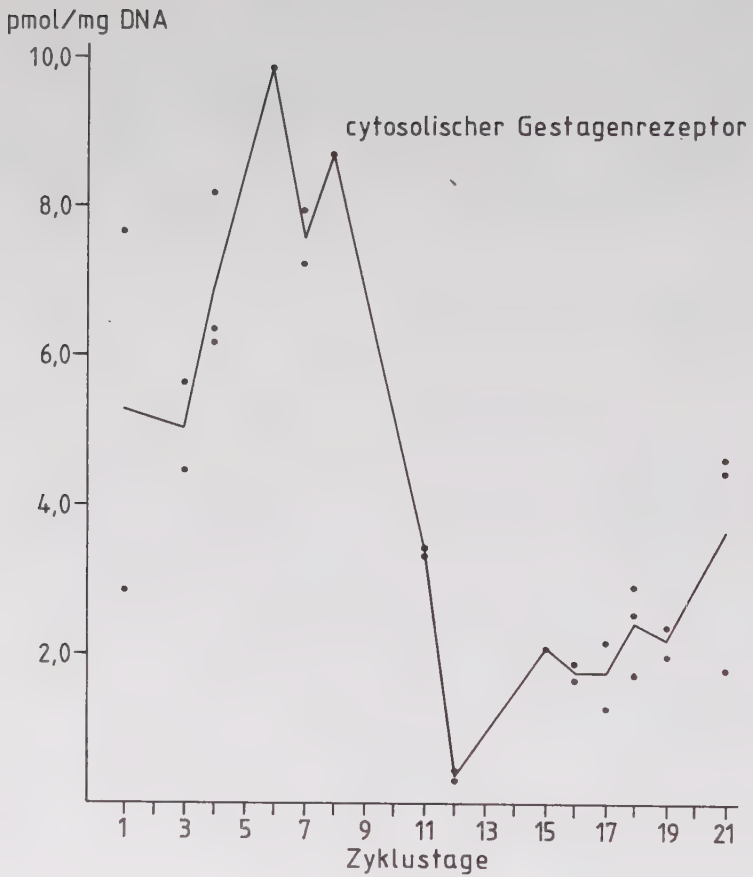


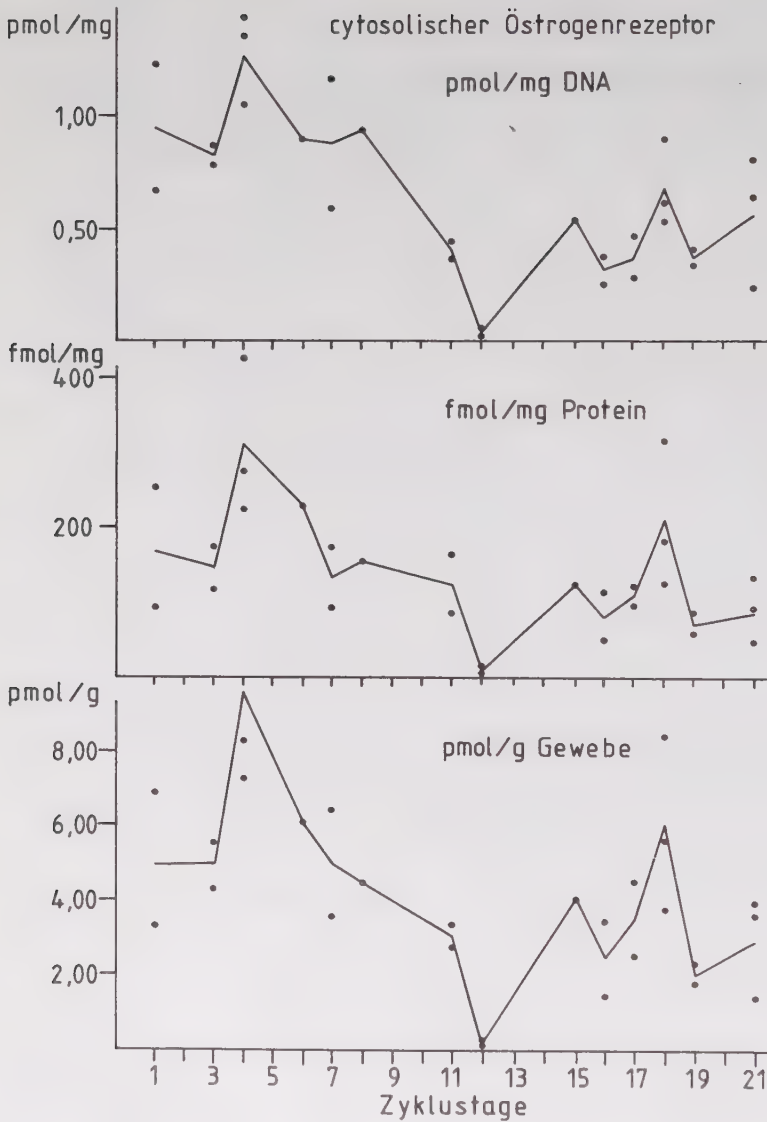
Abb.23: Konzentrationen des cytosolischen Gestagenrezeptors im Zyklusverlauf.

D Vergleich der Bezugsgrößen

Bei der hier gewählten Methode, die Proben aufzubereiten, ist es nicht möglich, die Konzentration des Ocytocinrezeptors auf eine andere Bezugsgröße als die Menge des Proteins in dem 280 000 g_{av}-Pellet zu beziehen.

Es erfolgte keine quantitative Extraktion des Ocytocinrezeptors aus dem Gewebe, sondern die Rezeptorkonzentration wurde in einem Gewebsaliquot bestimmt, das wegen der scharfen Vorzentrifugation sich nur noch aus sehr kleinen Partikeln des Homogenates mit einem hohen Anteil an Zellmembranbestandteilen zusammensetzte. Die gemessenen Konzentrationen des Ocytocinrezeptors können daher auch nicht direkt mit den Konzentrationen der anderen Rezeptoren oder mit Plasmaspiegeln von Hormonen in Beziehung gesetzt werden. Letzteres wäre allerdings bis zu einem gewissen Grad durch die Betrachtung der Dissoziationskonstanten möglich, wobei aber nicht bekannt ist, inwieweit die in vitro gemessenen Daten mit den Verhältnissen in vivo übereinstimmen. Für die Feststellung des Konzentrationsverlaufs im Zyklus ist eine gut standardisierte und reproduzierbare Methode wichtiger, als die Bestimmung der Absolutwerte. Als Bezugsgröße scheint der Proteingehalt der Membranfraktion gut geeignet, da er weniger vom im Verlauf des Zyklus sich ändernden Funktionszustand, Durchblutungsgrad oder Wassergehalt des Organs abhängig sein dürfte.

Abb. 24



Schwieriger zu beurteilen ist, welche die richtige Bezugsgröße für die Bestimmung der Steroidrezeptorkonzentrationen ist. Sich im Zyklus ändernder Durchblutungsgrad oder Wassergehalt des Uterusgewebes könnten sowohl den Proteingehalt des Cytosols, durch unterschiedliche Plasma-beimengungen, als auch das Naßgewicht des Gewebes beeinflussen. In die DNA-Konzentration gehen Funktionszustand der Zelle und Zellgröße nicht ein. Um eventuell unterschiedliche Einflüsse der verschiedenen Bezugsgrößen auf den Verlauf der Rezeptorkonzentrationen zu überprüfen, wurde sowohl die DNA-Konzentration, als auch die Proteinkonzentration im Cytosol und das Naßgewicht des eingesetzten Gewebes bestimmt. In Abbildung 24 (S. 82) sind für den cytosolischen Östrogenrezeptor die Verlaufskurven bezogen auf die drei erwähnten Parameter gegenübergestellt. Natürlich ergeben sich für die Rezeptorkonzentrationen bei den verschiedenen Bezugsgrößen unterschiedliche Größenordnungen. Aus der Gegenüberstellung ist aber zu erkennen, daß sich der Verlauf der Konzentrationen im Zyklus nicht verändert.

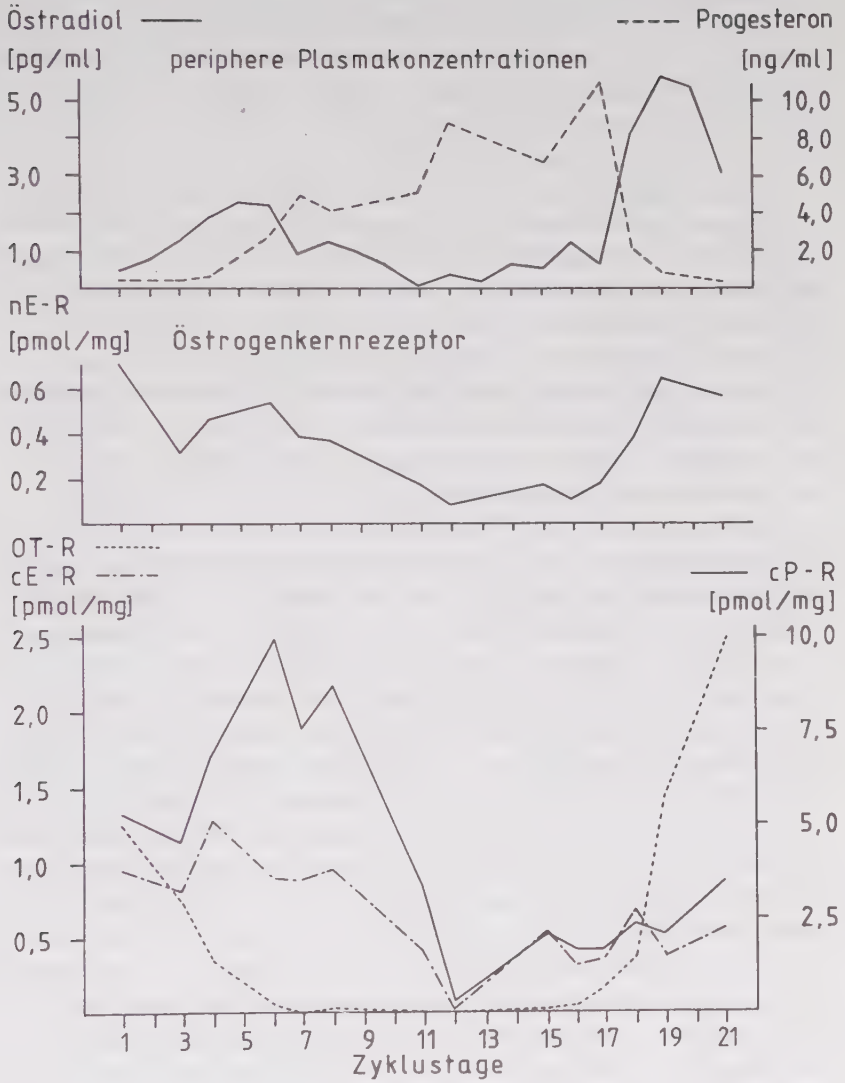
Abb.24 (S.82): Vergleich der Bezugsgrößen. Die Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors wurden auf die DNA-Konzentration, auf die Konzentration des cytosolischen Proteins und auf das Naßgewicht des Gewebes bezogen.

E Zusammenfassende Darstellung

Abschließend seien noch einmal alle Resultate in einer Grafik (Abb. 25) dargestellt, um zeitliche Zusammenhänge zu verdeutlichen. Den Kurven, die die Konzentrationen der verschiedenen Rezeptoren zeigen, sind die Verlaufskurven von Progesteron und Östradiol vorangestellt. Die Östradiol-Verlaufskurve im peripheren Plasma beim Rind ist einer Arbeit von POPE 1982 entnommen, der diese Werte sehr genau nach einer Vorreinigung des Plasmas mit HPLC im Radio-Immun-Test bestimmt hatte. Die Progesteron-Kurve entstand aus den Plasma-progesteronspiegeln der 28 Kalbinnen an den jeweiligen Schlachttagen.

Abb.25 (S.85): Zusammenfassende Darstellung der Rezeptor- und der Hormonkonzentrationen während des Zyklus. Im oberen Abschnitt sind die Konzentrationen des peripheren Plasma-Östradiols (POPE 1982) und des Plasmaprogestérons (eigene Daten) dargestellt. Die mittlere Grafik zeigt den Verlauf des Östrogenkernrezeptors (nE-R, pmol/mg DNA), unten sind die Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors (cE-R, pmol/mg DNA) und Gestagenrezeptors (cP-R, pmol/mg DNA) und des Ocytocinrezeptors (OT-R, pmol/mg Protein) im Verlauf des Zyklus dargestellt.

Abb. 25



D i s k u s s i o n

A Methodik

Scatchard-Analyse, Elektrophorese, Austestung von Kreuzreaktionen und Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden zur Validierung der verschiedenen Rezeptorbestimmungen durchgeführt. Im Zusammenhang mit der Bestimmung des Ocytocinrezeptors interessierte außerdem der Einfluß von endogenen Ocytocinkonzentrationen auf Konzentrationen und Meßbarkeit des Rezeptors. Nachstehend seien die bei der Beschreibung der einzelnen Rezeptorbestimmungen schon dargestellten Versuche genauer interpretiert.

Eine Ocytocindauerinfusion hat gezeigt, daß hohe endogene Ocytocinspiegel, wie sie kontinuierlich über 2 Tage unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommen, die Rezeptorkonzentrationen nicht deutlich absenken können. Die Rezeptorkonzentrationen liegen zwar bei allen drei Infusionstieren etwas unter den Werten der Kontrolltiere, doch angesichts der grossen individuellen Schwankungen der Rezeptorkonzentrationen an gleichen Zyklustagen und der geringen Anzahl der untersuchten Tiere, ist eine Absenkung der Konzentration des Ocytocinrezeptors nicht klar ersichtlich. Dieser Versuch zeigte, daß eine sog. "Downregulation" des Rezeptors durch Ocytocin nicht möglich ist und hohe endogene Ocytocinspiegel auch die Meßbarkeit des Rezeptors nicht wesentlich beeinflussen. Die Ausschaltung des Einflusses von endogenem Ocytocin auf die Rezeptorbestimmung ist darüberhinaus durch die Zugabe von DTT und EDTA zum Homogenisationspuffer weitgehend gewährleistet. Dies wurde durch den auf den Seiten 35 f. beschriebenen Versuch genauer charakterisiert und belegt.

Die Scatchard-Analysen, durchgeführt bei den cytosolischen Steroidrezeptoren und beim Ocytocinrezeptor, weisen alle eine deutliche Linearität auf und die extrapolierten Werte der maximalen Bindungskapazitäten stimmen bei den cytosolischen Steroidrezeptoren gut mit den Resultaten überein, die durch Inkubation des Rezeptors mit sättigenden Konzentrationen an ^3H -markiertem Hormon erhalten wurden.

Beim Gestagenrezeptor entsprechen die erhaltenen Dissoziationskonstanten den Angaben anderer Autoren (ZELINSKI et al. 1982). Auch beim Ocytocinrezeptor gibt es eine gute Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur (SOLOFF et al. 1973; SOLOFF et al. 1974a; NISSENSON et al. 1978). Der für den Östrogenrezeptor gefundene Wert liegt etwas höher als von anderen Autoren angegeben (HENRICKS et al. 1978; PACK et al. 1978; DEAVER et al. 1980). Der Grund für diese Abweichung ist nicht bekannt. Sie könnte mit dem Nachweis des Rezeptors über Heparin-Sepharose zu erklären sein. Möglicherweise bewirkt die Bindung des Rezeptors über Heparin an das Gel eine Konformationsänderung, die eine Veränderung der Affinität zum Liganden mit sich bringt. Trotzdem zeigt auch diese Scatchard-Analyse gut die Sättigungskinetik und Spezifität der ^3H -Östradiol-17 β -Bindung im Cytosol.

In der Agargelelektrophorese wandern die cytosolischen Steroidrezeptoren nur wenige Millimeter zur Anode oder bleiben am Start (JUNGBLUT et al. 1979), das durch Trypsinbehandlung aus dem Kern freigesetzte hormonbindende "Core-Protein" hat größtenteils seine Ladung geändert und wandert als basischer Rezeptor zur Kathode (JUNGBLUT et al. 1979; MEYER 1980). Die tryptischen Rezeptorfragmente sind in Bezug auf Ladung und Molekülgröße etwas heterogener, was zu einer Verbreiterung des Gipfels in der Elektrophorese führt. Die für die Steroidrezeptoren durchgeführten Elektrophoresen entsprechen diesen Erkenntnissen.

Für den Östrogen- und Gestagenrezeptor wurden einige Kreuzreaktionen mit anderen Steroiden getestet. Dabei zeigte

sich der Östrogenkernrezeptor noch eindeutiger als der cytosolische in hohem Maße spezifisch für Östrogene.

Mit einem 50fachen Überschuß an Östradiol-17 β ließ sich aber der Ligand für den Gestagenrezeptor zur Hälfte aus der Bindung verdrängen. Dies führte zu der Überlegung, ob die gemessenen Östrogenrezeptorkonzentrationen nicht zum Teil aus einer Bindung des ^3H -Östradiols an den Gestagenrezeptor herrühren. Dagegen spricht aber Folgendes:

1. Ein 50facher Überschuß an Östradiol war notwendig, um etwas mehr als 52 % des Org 2058 aus der Bindung zu verdrängen. Da die Affinität des Östradiols zu seinem eigenen Rezeptor wesentlich höher ist als zum Gestagenrezeptor, wäre bei einer Konzentration von 20 nM Östradiol nur ein vernachlässigbarer Anteil des Östradiols an den Gestagenrezeptor gebunden worden.
2. Der Östrogenrezeptor wurde über Heparin-Sepharose-Säulchen nachgewiesen, an denen der Gestagenrezeptor zu nur etwa 54 % bindet. Ein Vergleich des Gestagenrezeptornachweises über Heparin-Sepharose und Kohlebehandlung wird in nachstehenden Tabellen (Tab. 7 und 8) genauer dargestellt.

Tab. 7

Vergleich des Gestagenrezeptornachweises über Heparin-Sephärose und Kohlebehandlung (Konzentrationen des Gestagenrezeptors im Cytosol in nM)

Kohle- behandlung	Heparin-Sephärose	Rezeptorausbeute mit Heparin-Sephärose (Kohlebehandl.=100%)
3.06	1.70	55.6 %
1.82	1.28	70.3 %
7.14	3.43	48.0 %
8.15	3.86	47.4 %
9.66	4.68	48.4 %
	$\bar{x}$	53.9 $\pm$ 9,7 %

Tab. 8

Vergleich der Bindung von Östradiol-17 β in 50fachem Überschuß an den Gestagenrezeptor bei Nachweis über Kohlebehandlung oder Heparin-Sephärose. (Konzentration der Bindungsstellen im Cytosol in nM)

Kohlebehandlung		Heparin-Sephärose	
Bdg.von	Bdg.verdrängt	Bdg. von	Bdg.verdrängt
³ H-Org 2058	d.Östradiol	³ H-Org 2058	d.Östradiol
7.14	3.11	3.43	1.18
8.15	4.05	3.86	1.38
9.66	4.72	4.68	1.71

Bei Kohlebehandlung verdrängt Östradiol 47.4 $\pm$ 2.8 %, bei Nachweis über Heparin-Sephärose 35.6 $\pm$ 0.9 % des spez. gebundenen ³H-Organon 2058.

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen der cytosolischen Rezeptoren ist, wie bereits dargelegt, gut. Nicht zufriedenstellend ist allerdings die Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Östrogenkernrezeptors. Mit der Trypsinextraktion des Rezeptors aus dem Zellkern kommen bei der Aufarbeitung der Proben einige Schritte hinzu, die weitere Unwägbarkeiten mit sich bringen. Sicher hat die Qualität der Homogenisation einen Einfluß auf die Extraktionsausbeute. Die Trypsinaktivität könnte auch gewissen Schwankungen unterworfen gewesen sein, da das Trypsin durch das im Puffer anwesende DTT langsam inaktiviert wird.

B Physiologie

Vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Konzentrationen einiger Rezeptoren im Endometrium während des unbeeinflussten Zyklus des Rindes zu bestimmen. Diese Untersuchungen wurden angeregt von Arbeiten, die Hinweise für eine Rolle des Ocytocins bei der Zyklusregulation und bei der Auslösung der Luteolyse ergaben. So wurde von AMSTRONG und HANSEL 1959 gezeigt, daß mit exogener Ocytocin-Verabreichung am Anfang des Zyklus beim Rind die Dauer des Zyklus wesentlich verkürzt werden konnte. Ocytocininjektionen zu einem anderen Zeitpunkt des Zyklus hatten keinen Einfluß auf die Zykluslänge. Weitere Hinweise für eine Funktion des Ocytocins bei der Zyklusregulation ergaben sich einerseits aus der Beobachtung, daß mit Ocytocin im Brunstzeitraum beim Schaf in vitro und in vivo Prostaglandinsekretion aus dem Endometrium provoziert werden konnte (ROBERTS et al. 1976; McCracken 1980), andererseits aus Versuchen, die zeigten, daß die Luteolyse durch aktive Immunisierung gegen Ocytocin beim Schaf (SHELDRIK, MITCHELL, FLINT 1980) und bei der Ziege (COOKE, HOMEIDA 1985) verzögert

werden konnte. Die Ocytocinwirkung auf die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion trat parallel zum Vorkommen des Ocytocinrezeptors im Endometrium des Schafes auf. Dieser Umstand legte nahe, daß die Prostaglandinsekretion des Endometriums während der Luteolyse eventuell durch Ocytocin ausgelöst und auf Rezeptorebene reguliert wird.

Dabei fällt außerdem auf, daß Ocytocinrezeptoren bisher nur im Endometrium von Spezies gefunden wurden, bei denen auch im Corpus luteum im Zyklus Ocytocin gebildet wird. Im Endometrium des Schweines z.B., bei dem es kein ovarielles Ocytocin zu geben scheint, waren keine bzw. nur minimale Konzentrationen an Ocytocinrezeptoren meßbar. Die beobachtete geringe spezifische Bindung könnte aber auch durch Kontamination der Proben mit Myometriumanteilen zu erklären sein, zumal im Myometrium des Schweines schon einmal Ocytocinrezeptoren nachgewiesen wurden (SOLOFF et al. 1974a). Klare Zusammenhänge zwischen ovarielltem Ocytocin und Luteolyseinduktion haben sich aber bisher noch nicht ergeben.

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Ocytocinrezeptorkonzentration ihrerseits wiederum abhängig von Progesteron und Östradiol ist. Außerdem wird die Wirkung der Ovarsteroiden durch im Zyklusverlauf sich verändernde Rezeptorkonzentrationen zusätzlich moduliert. Das Zyklusgeschehen scheint somit, außer durch zentrale Einflüsse, noch durch ein kompliziertes Zusammenspiel von Östradiol- und Progesteronspiegeln einerseits, und deren Rezeptorkonzentrationen im Endometrium andererseits geregelt zu werden. Die Arbeiten von Roberts und McCracken (ROBERTS et al. 1976; McCracken 1980; McCracken et al. 1984) haben schließlich zu einem Modell geführt, nach dem der Zyklus beim Schaf auf Rezeptorebene reguliert wird und die Luteolyse nach dem Ansteigen der Ocytocinrezeptorkonzentration durch ocytocinbedingte Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ -Freisetzung ausgelöst wird. Nach dieser Hypothese wird das Endometrium gegen Ende der Lutealphase refraktär gegenüber Progesteron. Dies erklärt

sich aus dem Verbrauch von Gestagenrezeptoren, dem durch Östrogenabhängige Rezeptorsynthese nicht gegengesteuert werden kann, da die Wirkung des Östrogenrezeptors während der Lutealphase durch Progesteron zunächst gehemmt wird. Entfällt am Ende der Lutealphase die Progesteronwirkung, kommt es nacheinander zum Anstieg der Konzentrationen des Östrogenrezeptors, des Oxytocinrezeptors, zur oxytocinvermittelten PGF_{2α}-Sekretion und damit zur Luteolyse.

In der vorliegenden Arbeit hat nun interessiert, inwieweit diese Regulationsmechanismen auch beim Rind von Bedeutung sein könnten und ob eine Zyklusregulation auf Rezeptorebene bei Betrachtung des Verlaufs der Rezeptorkonzentrationen im unbeeinflussten Zyklus noch denkbar wäre.

Östrogene bewirken Rezeptorsynthese, sowohl die des eigenen Rezeptors, als auch die des Gestagen- und Oxytocinrezeptors (s.S.14 f.). Damit ist der Anstieg der Rezeptorkonzentration am Anfang des Zyklus zu erklären. Kurz vor und während der Brunst sind hohe Östradiolspiegel vorhanden, um den Tag 4 kommt es noch einmal zum Anstieg des Plasma-Östradiols. Dies forciert die Rezeptorsynthese und führt zu den Rezeptormaxima am Tag 5 für den Östrogen- und am Tag 7 für den Gestagenrezeptor. Das eventuell etwas früher erreichte Maximum der Östrogenrezeptorkonzentration könnte damit erklärt werden, daß durch den Plasmaöstradiolanstieg am Tag 4 eine verstärkte Translokation des cytosolischen Rezeptors in den Kern stattfindet und damit der Umsatz des Rezeptors erhöht wird. Der Rezeptorsynthese wird durch Translokation und Abbau so etwas entgegengesteuert. Der Progesteronspiegel ist zu diesem Zeitpunkt sehr niedrig, der Umsatz des Gestagenrezeptors damit ebenfalls. Die Synthese kann, durch Östradiol verstärkt, ablaufen, bis die Progesteronsekretion aus dem Corpus luteum deutlich ansteigt und Progesteron seine spezifische Wirkung entfaltet. Diese besteht u.a. in einer Unterdrückung der Östrogenwirkung und damit einem Nachlassen der Rezeptorsynthese. Mit der hohen

Progesteronsekretion aus dem Corpus luteum fallen somit nach und nach die Rezeptorkonzentrationen ab.

Aufgrund der geringen Anzahl der in der Mitte des Zyklus untersuchten Tiere ist es natürlich nicht möglich, den Tiefpunkt der Rezeptorkonzentrationen für einen bestimmten Zyklustag, etwa den Tag 12, festzulegen, zumal der Gestagenkernrezeptor nicht bestimmt wurde und der eigentliche Gestagenrezeptorgehalt deshalb nicht bekannt ist. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß zu diesem Zeitpunkt auch der Gehalt an Gestagenkernrezeptor sehr niedrig ist, da die Rezeptoren in sehr kurzer Zeit nach der Translokation abgebaut werden bzw. nicht mehr nachweisbar sind, auch wenn sich deren Wirkungen noch nicht vollständig entwickelt haben. Für die Östrogenrezeptoren hat sich ein annähernd paralleler Verlauf im Zyklus von cytosolischem Rezeptor und Kernrezeptor gezeigt. In der Mitte des Zyklus könnten sich Rezeptorsynthese und Translokation in den Kern wegen der hohen Progesteronspiegel in einem annähernden Gleichgewicht befinden, dessen Niveau immer niedriger wird und gegen Ende der Lutealphase einen Tiefpunkt erreicht. Eine Erschöpfung des Gestagenrezeptorsystems hätte zur Folge, daß die Progesteronwirkung, ungeachtet der hohen Plasmaprogesteronspiegel, nachläßt. Das bedeutet auch, daß die Hemmung der Östrogenwirkung nachläßt bzw. aufgehoben wird. Dies wiederum führt zur Erholung des Rezeptorsystems. Weil aber in diesem Stadium der Lutealphase sowohl die Östrogenrezeptorkonzentration als auch der Plasmaöstradiolspiegel sehr niedrig sind, erscheint es einleuchtend, daß diese Phase der Wiederauffüllung des Cytosols mit Östrogen- und Gestagenrezeptoren zunächst nur sehr langsam anläuft und eventuell einige Tage in Anspruch nimmt. Der langsame Anstieg nach diesem Rezeptorminimum in der Mitte des Zyklus, das gewissermaßen einen Umkehrpunkt in der Lutealphase darstellt, spricht für diese Deutung. In der McCrackenschen Hypothese kommt nun für die Auslösung der Luteolyse dem Ocytocin und dem Ocytocin-

rezeptor eine entscheidende Rolle zu. Die vielen Hinweise auf Zusammenhänge zwischen Ocytocin und Prostaglandinsekretion im Endometrium des Schafes ließen einen Luteolysemechanismus, wie er für das Schaf von McCracken vorgeschlagen wurde, auch für das Rind möglich erscheinen. Beim Rind allerdings konnte die die Prostaglandinsekretion hervorrufoende Potenz des Ocytocins in vitro nicht nachvollzogen werden (KOTWICA, SCHAMS 1986, persönliche Mitteilung). Zudem führt eine genauere Betrachtung der zeitlichen Zusammenhänge von Plasmaprogesteronspiegeln und endometrialen Rezeptorkonzentrationen eher zu dem Schluß, daß beim Rind Ocytocin bzw. das Ansteigen der Ocytocinrezeptorkonzentration zum Zeitpunkt der Luteolyse diese nicht auslösen können. Sicher ist das zeitliche Auflösungsvermögen in vorliegender Untersuchung zu gering, um zweifelsfrei zu entscheiden, ob die Konzentrationen des Ocytocinrezeptors vor oder während der Luteolyse ansteigen. Auch die geringe Anzahl der untersuchten Proben läßt eine gesicherte Aussage nicht zu. Sicher bestimmbare Ocytocinrezeptorkonzentrationen waren nur zu finden, wenn die Plasmaprogesteron-Konzentrationen schon eindeutig die Luteolyse anzeigten oder eben nach der Luteolyse. An den Tagen 15, 16, 17 war zwar ein leichter Anstieg der Konzentration des Ocytocinrezeptors zu registrieren, der parallel mit der langsamen Erholung des Steroidrezeptorsystems einherging. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß bei diesen Rezeptorkonzentrationen bei gleichzeitig niedrigen Plasmaocytoeinspiegeln eine ausreichende Ocytoeinwirkung möglich ist. Abgesehen davon bewegen sich die in diesen Tagen gemessenen Rezeptorkonzentrationen in dem bereits diskutierten Bereich an der Grenze der Meßbarkeit, was den Wert dieser Daten etwas einschränkt.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die Ergebnisse vorliegender Arbeit eher gegen eine kausale Bedeutung des Ocytocins und seines Rezeptors bei der Induktion der Luteolyse sprechen. Die schon einmal gefundene Möglichkeit,

in vivo mit Ocytocin während der allerdings schon in Gang gekommenen Luteolyse Prostaglandinsekretion auszulösen (SCHAMS, SCHALLENBERGER, MEYER, BULLERMANN, BREITINGER, ENZENHÖFER, KOLL, KRUIP, WALTERS, KARG 1985), weist darauf hin, daß Ocytocin die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Sekretion lediglich verstärkt und die Luteolyse beschleunigen kann. Diese Wirkung des Ocytocins müßte noch eingehender charakterisiert werden. Die entscheidende Rolle bei der Luteolyseinduktion beim Rind scheint aber den Östrogenen und den Östrogenrezeptoren zuzukommen. Die Auslösung der Luteolyse könnte nur durch bestimmte Konstellationen von Plasmaspiegeln der Ovarsterioide einerseits und den Rezeptorkonzentrationen im Endometrium andererseits gesteuert sein, vielleicht müssen aber auch bisher nicht berücksichtigte Faktoren in die weiter notwendigen Untersuchungen einbezogen werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Konzentrationen des Ocytocinrezeptors, des cytosolischen Östrogenrezeptors und des Östrogenkernrezeptors und die Konzentration des cytosolischen Gestagenrezeptors wurden im Verlauf des Zyklus im bovinen Endometrium untersucht. Dazu wurden 28 Kalbinnen an verschiedenen, genau definierten Zyklustagen geschlachtet. 3 Kalbinnen wurden zwischen den Tagen 19 - 21 bzw. 21 - 2 des Zyklus einer Ocytocindauerinfusion unterzogen, um den Einfluß von endogenem Ocytocin auf die Rezeptorkonzentration zu überprüfen. Außerdem wurden Ovarien und Eileiter des Rindes und Endometriumproben des Schweines in verschiedenen Zyklusstadien auf Ocytocinrezeptoren untersucht. Die Konzentrationen der cytosolischen Steroidrezeptoren wurden sowohl auf den DNA-Gehalt und die Proteinkonzentration, als auch auf das Naßgewicht des Gewebes bezogen.

Die Konzentration des Ocytocinrezeptors erreicht ihr Maximum am Tag 21 des Zyklus mit 2.46 ± 0.98 pmol/mg Protein. Sie steigt geringfügig ab Tag 15 und deutlich zur Luteolyse an und fällt nach der Brunst schnell wieder ab. Am Tag 6 gefundene Werte liegen bereits wieder unterhalb des Meßbereiches. Während der Lutealphase ist kein Ocytocinrezeptor nachzuweisen.

Eine Ocytocindauerinfusion konnte keine eindeutige Senkung der Ocytocinrezeptorkonzentrationen herbeiführen.

Keine Ocytocinrezeptoren konnten im Ovar des Rindes und in den Eileitern nachgewiesen werden.

In Endometriumproben von Schweinen, die an den Zyklustagen 10, 16 und während der Rausche geschlachtet wurden, konnten nur am Tag 16 Ocytocinrezeptoren gemessen werden. Die Konzentrationen lagen an der Meßbereichsgrenze und

bewegten sich in der Größenordnung von 40 - 60 fmol/mg Protein.

Die Konzentrationen der cytosolischen Östrogen- und Gestagenrezeptoren verlaufen im Zyklus in etwa parallel. Die Werte sind in den Tagen 3 - 7 am höchsten und liegen bei Östrogenrezeptor zwischen 0.8 und 1.4 pmol/mg DNA und beim Gestagenrezeptor zwischen 6 und 10 pmol/mg DNA. Die Konzentrationen beider Rezeptoren fallen zur Zyklusmitte (Tag 12) auf nicht mehr meßbare Werte ab, dem folgt ein langsamer Anstieg bis zur Brunst und ein schneller Anstieg bis zum erwähnten Maximum.

Schließlich werden Möglichkeiten des Zusammenspiels der verschiedenen Rezeptorkonzentrationen, ihre wechselseitige Modulation und die Rolle dieser Rezeptoren bei der Induktion der Luteolyse und der Regulation des Zyklus diskutiert.

S u m m a r y

The concentrations of oxytocin, estrogen and progesterone receptors during estrous cycle in bovine endometrium

The concentrations of oxytocin receptors, cytosolic and nuclear estrogen receptors and cytosolic progesterone receptors in bovine endometrium during estrous cycle were studied.

28 heifers were slaughtered on various exactly defined days of cycle. 3 heifers were subjected to an oxytocin infusion between days 19 and 21 or between days 21 and 2 resp. of estrous cycle to investigate the influence of oxytocin concentrations on the receptor levels. Furthermore concentrations of oxytocin receptors were studied in bovine ovaries and oviducts and in samples of pig endometrium taken at different stages of cycle. The concentrations of cytosolic steroid receptors were related to content of DNA, protein concentration and wet weight of tissue.

The oxytocin receptor level reached its maximum at 2.46 ± 0.98 pmol/mg protein on day 21 of cycle. There was a slight increase of concentration starting on day 15, followed by a marked rise during luteolysis and a quick decline after heat. Values measured on day 6 already were below measuring range. During luteal phase no oxytocin receptor was found.

Oxytocin infusion did not cause a distinguished decline of oxytocin receptor concentration.

No oxytocin receptors were found in bovine ovary and oviducts.

In samples of endometrium of pigs, which were slaughtered on days 10 and 16 of cycle or during heat resp., only on day 16 very low concentrations of oxytocin receptors could be measured. The values ranged about 40 - 60 fmol/mg

protein and were near the limit of detection range.

The concentrations of cytosolic estrogen and progesterone receptors followed a similar pattern during cycle reaching a maximum between days 3 and 7. Peak concentrations were 0.8 - 1.4 pmol/mg DNA for the cytosolic estrogen receptor and 6 - 10 pmol/mg DNA resp. for the cytosolic progesterone receptor. During the midluteal phase both receptor levels declined to unmeasurable values, then increased slowly until heat and subsequently increased quickly to the maximum.

In conclusion possible interactions between the different receptor levels, ways of alternate modulation and the effects of the receptors on induction of luteolysis and regulation of estrous cycle are discussed.

T a b e l l e n a n h a n g

zu Abb. 3:

Einfluß von EDTA und DTT auf die Bindung des Ocytocins an den Rezeptor.

TA [cpm]	TB	cpm bound		NSB
		DTT	EDTA	
24 544.8	932.7	367.5	243.5	268.5
	805.7	382.7	287.0	220.2
13 411.0	835.2	252.2	170.0	131.2
	754.5	253.2	148.5	132.5
8 602.4	717.2	172.5	98.2	88.5
	680.0	159.5	105.2	76.5
4 464.0	558.2	107.5	50.5	42.5
	490.5	114.2	67.5	62.5
2 228.7	354.7	73.2	40.5	22.0
	377.7	62.7	40.7	24.2

zu Abb. 4:

Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Ocytocinrezeptors
Konzentration des Ocyocinrezeptors in fmol/mg Protein
(n = 19)

1. Bestimmung 2. Bestimmung

560	586
1505	1606
399	375
687	974
1499	1613
307	366
723	545
652	669
1719	2254
1158	1659
3546	3452
57	135
205	389
1083	1434
2483	2158
1001	898
279	304
398	289
1280	1940

zu Abb. 5

Scatchard Plot des cytosolischen Östrogenrezeptors

[B] [pM]	B/F	[³ H-E ₂] [nM]
137.9	0.0078	17.75
152.1	0.0086	
146.0	0.0166	8.92
144.5	0.0165	
120.6	0.0272	4.56
127.4	0.0288	
88.1	0.0416	2.21
91.0	0.0430	
63.4	0.0635	1.06
65.4	0.0656	
37.6	0.0739	0.55
38.6	0.0760	
17.9	0.0693	0.28
19.8	0.0774	
13.7	0.1084	0.14
13.7	0.1087	
8.7	0.1531	0.06
9.4	0.1693	
3.7	0.1201	0.04
3.7	0.1207	

zu Abb. 7

Kreuzreaktionen

Durch einen 50fachen Überschuß an Hormon aus dem cytosolischen Östrogenrezeptor verdrängte Bindung (Bestimmung mit 2 Proben durchgeführt)

Hormon	absolut [nM]	relativ %
Östradiol-17 β	1.802/1.767	100.0 / 100.0
Östron	1.742/1.689	98.9 / 91.8
Progesteron	0.040/0.0	2.2 / 0.0
Testosteron	0.244/0.134	13.5 / 7.3
Organon 2058	0.137/0.0	7.6 / 0.0

zu Abb. 8

Reproduzierbarkeit der Bestimmung des cytosolischen Östrogenrezeptors. Konzentrationen in pmol/mg DNA.
(n = 15)

1. Bestimmung	2. Bestimmung
0.484	0.558
0.217	0.259
0.055	0.032
1.684	1.209
0.065	0.034
1.223	1.476
1.519	1.270
0.957	0.851
0.0	0.016
1.055	0.837
0.371	0.303
1.092	1.386
0.956	0.841
0.299	0.250
0.532	0.299

zu Abb. 10

Kreuzreaktionen

Durch einen 50fachen Überschuß an Hormon aus dem
Östrogenkernrezeptor verdrängte Bindung
(Bestimmung an 2 Proben durchgeführt)

Hormon	absolut [nM]	relativ %
Östradiol-17 β	1.484/1.067	100.0 / 100.0
Östron	0.999/0.702	67.3 / 65.6
Progesteron	0.027/0.0	1.8 / 0.0
Testosteron	0.065/0.093	4.4 / 8.7
Organon 2058	0.0 / 0.0	0.0 / 0.0

zu Abb. 11

Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Östrogenkernrezeptors.
Konzentrationen in pmol/mg DNA
(n = 15)

1. Bestimmung	2. Bestimmung
0.374	0.465
0.831	0.847
0.134	0.071
0.452	0.547
0.075	0.100
0.336	1.172
0.432	1.290
0.412	0.669
0.088	0.062
0.127	0.611
0.585	0.915
0.716	1.142
0.449	0.508
0.209	0.209
0.406	0.685

zu Abb. 12

Scatchard Plot des cytosolischen Gestagenrezeptors

[B][nM]	B/F	[³ H-Org] [nM]
5.68	0.3868	20.37
5.88	0.4060	
5.63	0.4894	17.14
5.89	0.5234	
4.93	0.7674	11.34
4.94	0.7700	
4.07	1.1526	7.59
4.33	1.3285	
2.98	1.6885	4.75
3.09	1.8586	
2.14	1.9690	3.23
2.20	2.1381	
0.98	2.1695	1.43
1.02	2.5362	
0.70	2.0913	1.03
0.74	2.4996	

zu Abb. 14

Kreuzreaktionen

Durch einen 50fachen Überschuß an Hormon aus dem cytosolischen Gestagenrezeptor verdrängte Bindung (Bestimmung mit 2 Proben durchgeführt)

Hormon	absolut [nM]	relativ %
Organon 2058	9.657/4.743	100.0 / 100.0
Progesteron	8.462/4.172	87.6 / 88.0
Östradiol	5.150/2.242	53.3 / 47.3
Östron	3.220/1.450	33.4 / 30.6
Testosteron	3.925/1.675	40.6 / 35.3

zu Abb. 15

Reproduzierbarkeit der Bestimmung des cytosolischen Gestagen-
rezeptors. Konzentrationen in pmol/mg DNA
(n = 15)

1. Bestimmung	2. Bestimmung
1.234	2.250
1.385	2.251
0.792	0.133
5.925	6.491
0.557	0.885
9.001	7.412
12.736	12.242
9.852	9.869
0.215	0.427
10.571	6.897
1.878	2.124
7.908	7.428
3.589	2.258
2.259	2.108
2.818	1.936

zu Abb. 19

Konzentrationen des Ocytocinrezeptors während des Zyklus in
pmol/mg Protein (Einzelwerte mit Mittelwert und Standard-
abweichung)

Tag 1-2	Tag 3-7	Tag 8-17	Tag 18-19	Tag 20-21
0.32	0.64	keine Bdg.	0.19	1.06
0.71	0.17	bei 26 Uteri	0.13	0.51
0.30	0.61	0.02	0.95	1.00
0.96	0.17	0.03	0.29	1.24
1.14	0.15	0.29	0.77	2.35
0.97	0.46	0.03	0.34	1.56
1.56	0.30	0.06	0.29	3.50
0.95	0.35	0.10	0.22	2.32
	0.39	0.30	0.43	
	0.83	0.02	0.57	
	0.34	0.05	1.26	
	0.63		0.26	
	0.34		0.29	
			1.61	
0.86±0.42	0.41±0.21	0.03±0.07	0.54±0.45	1.69±0.97

zu Abb. 20

Periphere Plasmaprogesteronspiegel und Ocytocinrezeptorkonzentrationen an verschiedenen Zyklustagen

Zyklus- tag	Plasma-Progesteron [ng/ml]			Ocytocinrezeptor [fmol/mg Protein]		
	Einzeltiere		$\bar{x}$	Einzeltiere		$\bar{x}$
1	<0.5	0.7	<0.6	1556/ 950		1253
3	<0.5	0.7	<0.6	830/ 634		732
4	0.6	1.8	0.6	387/ 336/ 346		356
6	3.1		3.1	60		60
7	4.7	5.5	5.1	0/ 0		0
8	4.3		4.3	25		25
11	5.8	4.8	5.3	0/ 0		0
12	10.8	7.1	9.0	0/ 0		0
15	6.8		6.8	34		34
16	6.7	10.8	8.8	96/ 0		48
17	13.6	8.5	11.0	297/ 54		176
18	2.5	1.7	3.1	573/ 292/ 263		376
19	0.9	1.1	1.0	1258/1610		1434
21	<0.5	<0.5	<0.5	1576/3499/2320		2465

zu Abb. 21

Konzentrationsverlauf des cytosolischen Östrogenrezeptors

Zyklustag	Rezeptorkonzentration [pmol/mg DNA]		
	Einzeltiere		$\bar{x}$
1	0.668	1.239	0.954
3	0.789	0.855	0.822
4	1.428	1.350	1.056
6	0.904		0.904
7	1.177	0.597	0.887
8	0.946		0.946
11	0.374	0.442	0.408
12	0.044	0.008	0.026
15	0.545		0.545
16	0.386	0.254	0.320
17	0.453	0.274	0.364
18	0.521	0.607	0.898
19	0.337	0.416	0.376
21	0.238	0.644	0.808

zu Abb. 22

Konzentrationsverlauf des Östrogenkernrezeptors

Zyklustag	Rezeptorkonzentration [pmol/mg DNA]		
	Einzeltiere		$\bar{x}$
1	0.485	0.929	0.707
3	0.349	0.293	0.321
4	0.500	0.754	0.148
6	0.540		0.540
7	0.476	0.312	0.394
8	0.369		0.369
11	0.169	0.173	0.171
12	0.102	0.075	0.089
15	0.174		0.174
16	0.127	0.094	0.110
17	0.150	0.209	0.180
18	0.420	0.208	0.478
19	0.750	0.546	0.648
21	0.839	0.420	0.438

zu Abb. 23

Konzentrationsverlauf des cytosolischen Gestagenrezeptors

Zyklustag	Rezeptorkonzentration [pmol/mg DNA]			$\bar{x}$
	Einzeltiere			
1	2.886	7.668		5.277
3	4.480	5.625		5.052
4	6.208	8.206	6.385	6.933
6	9.860			9.860
7	7.952	7.260		7.606
8	8.734			8.734
11	3.398	3.390		3.394
12	0.462	0.321		0.392
15	1.095			1.095
16	1.686	1.891		1.788
17	1.291	2.184		1.738
18	1.741	2.514	2.924	2.393
19	2.001	2.377		2.189
21	1.818	4.627	4.448	3.631

Zu Abb.24

Die Konzentrationen des cytosolischen Östrogenrezeptors im Zyklus, bezogen auf die DNA-Konzentration, Proteinkonzentration im Cytosol und das Naßgewicht des Gewebes.

Zyklustag	[pmol/mg DNA]			Rezeptorkonzentrationen			[fmol/mg cytosol.Protein]			[pmol/g Gewebe]		
	Einzeltiere			Einzeltiere			Einzeltiere			Einzeltiere		
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$
1	0.668	1.239	0.954	93	251	172	3.145	6.910	5.028			
3	0.789	0.855	0.822	117	175	146	4.300	5.506	4.903			
4	1.428	1.350	1.278	425	223	307	12.810	8.191	7.229			
6	0.904		0.904	229		229	6.116					
7	1.177	0.597	0.887	172	91	132	6.431	3.601	5.016			
8	0.946		0.946	150		150	4.420		4.420			
11	0.374	0.442	0.408	86		164	2.759	3.334	3.046			
12	0.044	0.008	0.026	12	3	8	0.286	0.060	0.173			
15	0.545		0.545	124		124	4.046		4.046			
16	0.386	0.254	0.320	114	50	82	3.456		1.498			
17	0.453	0.274	0.364	121	92	106	4.509		2.534			
18	0.521	0.607	0.676	124	180	316	3.752	5.545	8.385			
19	0.337	0.416	0.376	57	86	71	2.272	1.795	2.034			
21	0.238	0.644	0.808	43	127	89	1.394	3.918	3.571			

Abkürzungsverzeichnis

a	Steigung
A	Arterie
Abb.	Abbildung
b	Schnittpunkt mit der Ordinate
B	Bindung
B/F	Quotient aus gebundenem und freiem Hormon
BSA	bovines Serumalbumin
CBG	corticosteroid binding globulin bzw. Transkortin
Ci	Curie
C.l.	Corpus luteum
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
cE-R	cytosolischer Östrogenrezeptor
cP-R	cytosolischer Gestagenrezeptor
dpm	Zerfälle pro Minute (disintegrations per minute)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E ₂	Östradiol-17 β
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EM	Emission
E ₆₁₀	Extinktion (bei 610 nm)
g	Gramm
g _{av}	mittlere Erdbeschleunigung
h	Stunde
³ H	Tritium
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
K _D	Dissoziationskonstante
LH	Luteinisierendes Hormon
M	molar

mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
n	Probenanzahl
nE-R	Östrogenkernrezeptor
NSB	unspezifische Bindung
OT	Ocytocin
OT-R	Ocytocinrezeptor
Org 2058	Organon 2058 (synthetisches Progesteronanalogue)
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PSD	Phosphat-Surfynol-DTT-Puffer (s.S.29)
[R]	Rezeptorkonzentration
R	Korrelationskoeffizient
R 5020	synthetisches Progesteronanalogue
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
sec	Sekunde
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TA	Gesamtaktivität
TB	Gesamtbindung
TEDG	Tris-EDTA-DTT-Gelatine-Puffer (s.S.27)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
V	Vene

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Alexandrova, M., M. S. Soloff (1980a): Oxytocin Receptors and Parturition. I. Control of Oxytocin Receptor Concentration in the Rat Myometrium at Term. *Endocrinology* 106, 730-735

Alexandrova, M., M. S. Soloff (1980b): Oxytocin Receptors and Parturition. II. Concentrations of Receptors for Oxytocin and Estrogen in the Gravid and Nongravid Uterus at Term. *Endocrinology* 106, 736-738

Alexandrova, M., M. S. Soloff (1980c): Oxytocin Receptors and Parturition. III. Increases in Estrogen Receptor Concentrations in the Rat Myometrium During Prostaglandin $F_{2\alpha}$ - Induced Abortion. *Endocrinology* 106, 739-743

Alexandrova, M., M. S. Soloff (1980d): Oxytocin Receptors and Parturition in the Guinea Pig. *Biology of Reproduction* 22, 1106-1111

Armstrong, D.T., W. Hansel (1959): Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin. *J. Dairy Sci.* 42, 533-542

Atkins, D.T., D.C. Kraemer, P.G. Harms, J.L. Fleeger (1980): Progesterone-receptor complex in the nuclear fraction of the bovine endometrium. *Biology of Reproduction* 23, 2, 317-323

Bercu, B.B., A. Hyashi, M. Poth, M. Alexandrova, M.S. Soloff, P. K. Donahoe (1980): Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-Induced Delay of Parturition. *Endocrinology* 107, 504 ff.

Bonne, D., P. Cohen (1975): Characterization of Oxytocin Receptors on Isolated Rat Fat Cells. *Eur.J.Biochem.* 56, 295-303

Cooke, R.G., A.M. Homeida (1985): Suppression of prostaglandin $F_{2\alpha}$ release and delay of luteolysis after active immunization against oxytocin in the goat. *J. Reprod.Fert.*, 75, 63-68

Crankshaw, D. J., L. A. Branda, M. A. Matlib, E.E. Daniel (1978): Localisation of the Oxytocin Receptor in the Plasma Membrane of Rat Myometrium. *Eur.J. Biochem.* 86, 481-486

Deaver, D.R., H.D. Guthrie (1980): Cytoplasmic estrogen receptor, estradiol and progesterone concentrations in endometrium of nonpregnant and pregnant pigs. *Biology of Reproduction* 23, 1, 72-77

D'Istria, M., F. Citarella, G. Enne, A.R. Genazzani, L. Perotti, G. Delrio (1980): Sex steroid receptors in the uterus of sows during the oestrus cycle. 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 16th - 20th June 1980, III. Symposia (free communications), 34, Abstract.

Den, K., H. Sakamoto, S. Kimura, S. Takagi (1981): Study of Oxytocin Receptor: II. Gestational Changes in Oxytocin Activity in the Human Myometrium. *Endocrinol.Japon.* 28, 375-379

Duffy, M.J. (1980): Measurement of Progesterone Receptors in Human Breast Tumors Using the Synthetic Progesterin 16-Ethyl-21-Hydroxy-19-Nor-Pregnene-3,20-Dione. *J. Steroid Biochem.* 13, 1005-1007

Evans, R.W., T.J. Chen, W.J. Hendry III, W.W. Leavitt (1980): Progesterone Regulation of Estrogen Receptor in the Hamster Uterus during the Estrous Cycle. *Endocrinology* 107, 383-390

Fleischmann, G., M. Beato (1978): Characterization of Progesterone Receptor of Rabbit Uterus with the Synthetic Progesterin 16-Ethyl-21-Hydroxy-19-Norpregn-4-ene-3,20-Dione. *Biochimica et Biophysica Acta*, 540, 500-517

Flint, A.P.F., E.L. Sheldrick (1985): Continuous infusion of oxytocin prevents induction of uterine oxytocin receptor and blocks luteal regression in cyclic ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 2, 623-631

Flores, R., (1978): A Rapid and Reproducible Assay for Quantitative Estimation of Proteins Using Bromophenol Blue. *Analytical Biochemistry* 88, 605-611

Flouret, G., S. Terada, F. Yang, S.H. Nakagawa, T. Nakahara, O. Hechter (1977): Iodinated Neurohypophyseal Hormones as Potential Ligands for Receptor Binding and Intermediates in Synthesis of Tritiated Hormones. *Biochemistry* 16, 2119-2124

Fuchs, A.-R., S. Periyasamy, M. Alexandrova, M. S. Soloff (1983a): Correlation between Oxytocin Receptor Concentration and Responsiveness to Oxytocin in Pregnant Rat Myometrium: Effects of Ovarian Steroids. *Endocrinology* 113, 742-749

Fuchs, A.-R., S. Periyasamy, M.S.Soloff (1983b): Systemic and local regulation of oxytocin receptors in the rat uterus, and their functional significance. *Can.J.Biochem.Cell Biol.* 61, 615 - 624

Fuchs, A.-R., F. Fuchs, M. S. Soloff (1985): Oxytocin Receptors in Nonpregnant Human Uterus. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 60, 37-41

Henricks, D.M., R.B. Harris, Jr.(1978): Cytoplasmic estrogen receptors and estrogen concentrations in bovine uterine endometrium. *Endocrinology* 103, 1, 176-185

Hoffmann, B., H.J. Kyrein, M.L. Ender (1973): An efficient procedure for the determination of progesterone by radio immunoassay applied to bovine peripheral plasma. *Hormone Research* 4, 302-310

Hsueh, A.J.W., E.J.Peck, Jr., J.H.Clark (1976): Control of Uterine Estrogen Receptor Levels by Progesterone. *Endocrinology* 98, 438-444

Jungblut, P.W., J. Gaues, A. Hughes, E. Kallweit, W. Sierralta, P.I. Szendro, R.K. Wagner (1976): Activation of Transcription-Regulating Proteins by Steroids. *J. Steroid Biochem.* 7, 1109-1116

Jungblut, P.W., E. Kallweit, W. Sierralta, A.J. Truitt, R.K. Wagner (1978a): Estradiol and receptor content of uterine nuclei from ovariectomized and ovariectomized/adrenalectomized pigs. *Acta endocr. Copenh.Suppl.* 215, 87, 136-137

Jungblut, P.W., E. Kallweit, W. Sierralta, A.J. Truitt, R.K. Wagner (1978b): The Occurrence of Steroid-Free "Activated" Estrogen Receptor in Target Cell Nuclei. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 359, 1259-1268

Jungblut, P.W., A. Hughes, J. Gaues, E. Kallweit, I. Maschler, F. Parl, W. Sierralta, P.I. Szendro, R.K. Wagner (1979): Mechanisms Involved in the Regulation of Steroid Receptor Levels. *J. Steroid.Biochem.* 11, 273-278

Jungblut, P.W., J. Gaues, L. Görlich, A. Hughes, E. Kallweit, J. Kielhorn, M. Little, I. Maschler, S. McCann, F. Parl, G.C. Rosenfeld, W. Sierralta, G. Stone, P.I. Szendro, C. Teran, A.J. Truitt, R.K. Wagner (1980): Intracellular Actions of Gonadal Steroids. *Exp.Brain Research Suppl.* 3: Gonadal Steroids and Brain Function, 37-60

Jungblut, P.W., N. Hekim, H.H.D. Meyer, W.D. Sierralta, P.I. Szendro (1983): Subcellular Distribution, Properties and Interrelationship of Oestrogen Receptors in Endometrium and other Target Tissues. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 21, 473-480

- Koenders, A.J.M., J. Geurts-Moespot, L.V.A.M. Beex, Th.J. Benraad (1979): Assay of progesterone receptor binding sites with 17,21-dimethyl-19-norpregna-4,9-diene-3,20-dione and 16-ethyl-hydroxy-19-nor-4-pregnene-3,20-dione as the radioactive ligands. *J. Endocrinol.* 80, 15P
- Koligian, K.B., F. Stormshak (1977): Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors in ovine endometrium during the estrous cycle. *Endocrinology* 101, 2, 524-533
- Kotwica, I., D. Schams (1986): persönliche Mitteilung
- Koziorowski, M., G. Kotwica, S. Stefanczyk, T. Krzymowski (1984): Estradiol, progesterone and testosterone receptors for pig endometrium and myometrium at various stages of the estrous cycle. *Experimental and Clinical Endocrinology* 84, 3, 285-293
- Labarca, C., K. Paigen (1980): A Simple, Rapid, and Sensitive DNA Assay Procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352
- Leavitt, W.W., R.G. MacDonald, W.C. Okulicz (1983): Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptor systems. *Biochemical actions of hormones*, Vol X (G. Litwack, Editor) Academic Press, New York, 324-356
- Leavitt, W.W. (1985a): Hormonal regulation of myometrial estrogen, progesterone, and oxytocin receptors in the pregnant and pseudopregnant hamster. *Endocrinology* 116, 1079-1084
- Leavitt, W.W., W.C. Okulicz, J.A. McCracken, W. Schramm, W.F. Robidoux, Jr. (1985b): Rapid Recovery of Nuclear Estrogen Receptor and Oxytocin Receptor in the Ovine Uterus Following Progesterone Withdrawal. *J. Steroid Biochem.* 22, Nr. 6, 687-691
- Little, M., G.C. Rosenfeld, P.W. Jungblut (1972): Cytoplasmic Estradiol "Receptors" Associated with the "Microsomal" Fraction of Pig Uterus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 231-242
- Little, M., P.I. Szendro, C. Teran, A. Hughes, P.W. Jungblut (1975): Biosynthesis and transformation of microsomal and cytosol estradiol receptors. *J. Steroid Biochem.* 6, 493-500
- McCracken, J.A. (1980): Hormone receptor control of PGF_{2α} secretion by the ovine uterus. *Adv. Prosta. Thromb. Res.* 8, 1329-1344

McCracken, J.A., W. Schramm, W.C. Okulicz (1984): Hormone Receptor Control of Pulsatile Secretion of PGF_{2α} from the Ovine Uterus During Luteolysis and its Abrogation in Early Pregnancy. *Animal Reproduction Science* 1, 31-55

Markle, H.V., J.L. Warr, L.A. Branda (1978): Oxytocin binding sites in lactating rabbit mammary gland. *Can. J. Biochem.* 56, 968-976

Meyer, H.H.D. (1980): Isolierung und Charakterisierung des Steroid-bindenden "Core-Proteins" aus verschiedenen Formen des Östradiolrezeptors. Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover, Dissertation

Miller, B.G., L. Murphy, G.M. Stone (1977): Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *J. Endocr.* 73, 1, 91-98

Molinari, A.M., N. Medici, B. Moncharmont, G.A. Puca (1977): Estradiol receptor of calf uterus: Interaction with heparin-agarose and purification. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 4886-4890

Nissenson, R., G. Flouret, O. Hechter (1978): Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75, 2044-2048

Nissenson, R. A., G. Flouret, O. Hechter (1980): Oxytocin Receptors Coupled to Uterine Contraction in Estrogen-Dominated Rabbits. *Biochim. Biophys. Acta*, 628, 209-219

Okulicz, W.C., R.G. MacDonald, W.W. Leavitt (1981): Progesterone-Induced Estrogen Receptor-Regulatory Factor in Hamster Uterine Nuclei: Preliminary Characterization in a Cell-Free System. *Endocrinology* 109, Nr. 6, 2273-2275

Pack, B.A., C. Christensen, M. Douraghy, S.C. Brooks (1978): Nuclear and Cytosolic Estrogen Receptor in Gilt Endometrium throughout the Estrous Cycle. *Endocrinology* 103, 2129-2136

Pearlmutter, A.F., M. S. Soloff (1979): Characterization of the Metal Ion Requirement for Oxytocin-Receptor Interaction in Rat Mammary Gland Membranes. *J. Biol.Chem.* 254, 3899-3906

Pelley, J.W., Ch.W. Garner, G.H. Little (1978): A Simple Rapid Biuret Method for the Estimation of Protein in Samples Containing Thiols. *Analytical Biochemistry* 86, 341-343

- Pliska, V., J. Heiniger, A. Müller-Lhotsky, B.A. Eckberg (1984): Oxytocin receptors in sheep and rat myometrium: high or low affinity sites? *Journal of Steroid Biochemistry* 20, 1505 (Abstract F 14)
- Pope, G.S. (1982): Oestrogens and Progesterone in Plasma and Milk of Post-Partum Dairy Cattle. Aus: Factors Influencing Fertility in the Postpartum Cow (Seminar in the CEC Programme of Coordination of Research on Beef Production, 30.09.-02.10.81 Freising) Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London, 248-276
- Radnor, C.J.P. (1972): Myoepithelium in involuting mammary glands of the rat. *J. Anat.* 112, 355-365
- Rexroad, C.E.Jr. (1981): Estrogen and progestogen binding in the myometrium of the ewe. II. Regulation by estradiol and progesterone. *Journal of Animal Science* 53, 4, 1070-1076
- Roberts, J.S., B. Barcikowski, L. Wilson, Jr., R.C. Skanes, J.A. McCracken (1975): Hormonal and related factors affecting the release of $\text{PGF}_{2\alpha}$ from the uterus. *J. Steroid Biochem.* 6, 1091-1097
- Roberts, J. S., J.A. McCracken, J. E. Gavagan, M. S. Soloff (1976): Oxytocin-Stimulated Release of Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ from Ovine Endometrium in Vitro: Correlation with Estrous Cycle and Oxytocin-Receptor Binding. *Endocrinology* 99, 1107-1114
- Sakamoto, H., K. Den, K. Yamamoto, T. Arai, S. Kawai, Y. Oyama, T. Yoshida, S. Takagi (1979): Study of Oxytocin Receptor in Human Myometrium Using Highly Specific ^3H -Labeled Oxytocin. *Endocrinol. Japon.* 26, 515-522
- Scatchard, G. (1949): The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51, 660-672
- Schams, D., H. Karg (1969): Radioimmunologische LH-Bestimmung im Blutserum vom Rind unter besonderer Berücksichtigung des Brunstzyklus. *Acta endocr., Copenh.* 61, 96-103
- Schams, D., E. Schallenberger, B. Hoffmann, H. Karg (1977): The Oestrus Cycle of the Cow: Hormonal Parameters and Time Relationships Concerning Oestrus, Ovulation, and Electrical Resistance of the Vaginal Mucus. *Acta endocr., Copenh.* 86, 180-192
- Schams, D. (1983): Oxytocin determination by radioimmunoassay III. Improvement to subpicogram sensitivity and application to blood levels in cyclic cattle. *Acta endocr.* 103, 180-183

Schams, D., E. Schallenberger, H.H.D. Meyer, B. Bullermann, H.-J. Breiting, G. Enzenhöfer, R. Koll, Th.A.M. Kruip, D.L. Walters and H. Karg (1985): Ovarian oxytocin during the estrous cycle in cattle. In: OXYTOCIN, Clinical and Laboratory Studies, Proceed. of the Second International Conference on Oxytocin, Lac Beauport, Quebec, Canada, June 29 to July 1, 1984, Ed. J.A. Amico, Pittsburg and A.G. Robinson, Pittsburg, Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford, 317-334

Schams, D., R. Koll, R. Ivell, Th. Mittermeier, Th.A.M. Kruip (1987): The Role of Oxytocin in Follicular Growth and Luteal Function. In: "Follicular Growth and Ovulation in Farm Animals", Ed. J.F. Roche, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London, in Druck

Schroeder, B.T., J. Chakraborty, M.S. Soloff (1977): Binding of [^3H]Oxytocin to Cells Isolated from the Mammary Gland of the Lactating Rat. The Journal of Cell Biology 74, 428-440

Senior, B.E. (1975): Cytoplasmic oestradiol-binding sites and their relationship to oestradiol content in the endometrium of cattle. J.Reprod.Fert. 44, 3, 501-511

Sheldrick, E.L., M.D. Mitchell, A.P.F. Flint (1980): Delayed luteal regression in ewes immunized against oxytocin. J.Reprod.Fert. 59, 1, 37-42

Sheldrick, E.L., A.P.F. Flint (1985): Endocrine control of uterine oxytocin receptors in the ewe. J.Endocr. 106, 249-258

Sierralta, W.D., P.I. Szendro, E. Kallweit, P.W. Jungblut (1985): Estradiol receptor synthesis in ergastoplasm of porcine endometrium cells. (Abstract). Acta endocr. 108, Suppl. 267, 124-125

Smith, C.W., S. Chan, R. Walter (1977): Dose-response behaviour on the isolated rat uterus of oxytocin analogs with modifications at binding sites. J. Pharmacol. Exp.Ther. 203, 120-124

Soloff, M. S., Th.L. Swartz, M. Saffran (1972): "Specific Uptake of Radioactivity from ^3H -Oxytocin by Surviving Segments of Mammary Gland". Endocrinology 91, 213-216

Soloff, M.S., Th.L. Swartz (1973a): Characterization of a Proposed Oxytocin Receptor in Rat Mammary Gland. J. Biol. Chem. 248, 6471-6478

Soloff, M.S., Th.L. Swartz, M. Morrison, M. Saffran (1973b): Oxytocin Receptors: Oxytocin Analogs, but not Prostaglandins, Compete with ^3H -Oxytocin for Uptake by Rat Uterus. *Endocrinology* 92, 104-107

Soloff, M.S., Th.L. Swartz (1974a): Characterization of a Proposed Oxytocin Receptor in the Uterus of the Rat and Sow. *J. Biol.Chem.* 249, 1376-1381

Soloff, M.S., Th.L. Swartz, Abraham H. Steinberg (1974b): Oxytocin Receptors in Human Uterus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38, 1052-1056

Soloff, M.S. (1975a): Oxytocin Receptors in Rat Oviduct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 2, 671-677

Soloff, M.S. (1975b): Uterine Receptor for Oxytocin: Effects of Estrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 205-212

Soloff, M.S., H. D. Rees, M. Sar, W. E. Stumpf (1975c): Autoradiographic Localisation of Radioactivity from [^3H] Oxytocin in the Rat Mammary Gland and Oviduct. *Endocrinology* 96, 1475-1477

Soloff, M.S. (1976): Oxytocin Receptors in the Mammary Gland and Uterus. *Methods in Receptor Research Part III*, Ed.: Melvin Blecher, Marcel Dekker Inc. New York and Basel 1976, Ch. 16, 511-531

Soloff, M.S., B.T. Schroeder, J. Chakraborty, A.F. Pearlmutter (1977): Characterization of oxytocin receptors in the uterus and mammary gland. *Fed.Proc.* 36, 1861-1866

Soloff, M.S. (1979a): Minireview: Regulation of Oxytocin Action at the Receptor Level. *Life Sciences* 25, 1453-1460

Soloff, M.S., M. Alexandrova, M.J. Fernstrom (1979b): Oxytocin Receptors: Triggers for Parturition and Lactation? *Science* 204, 1313-1315

Soloff, M.S., A.F. Pearlmutter (1979c): Biochemical actions of neurohypophysial hormones and neurophysin. In: *Biochemical actions of hormones Vol.6*, Ch 6 (G. Litwack, Editor) Academic Press, New York, NY, pp.265-333

Soloff, M.S. (1982a): Oxytocin Receptors and Mammary Myo-epithelial Cells. *J. Dairy Sci.* 65, 326-337

Soloff, M.S., P. Sweet (1982b): Oxytocin Inhibition of (Ca^{++} - Mg^{++})-ATPase Activity in the Rat Myometrial Plasma Membranes. *J.Biol.Chem.* 257, 10687-10693

Soloff, M.S., M.A. Fernstrom, S. Periyasamy, S. Soloff, S. Baldwin, M. Wieder (1983a): Regulation of oxytocin receptor concentration in rat uterine explants by estrogen and progesterone. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 625-630

Soloff, M. S., M. H. Wieder (1983b): Oxytocin receptors in rat involuting mammary gland. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 631-635

Thompson, E. E., P. Freychet, J. Roth (1972): Monojodo-oxytocin: Demonstration of Its Biological Activity and Specific Binding to Isolated Fat Cells. *Endocrinology* 91, 1199-1205

Toft, D.O., J. Gorski (1966): A receptor molecule for estrogens: isolation from rat uterus and preliminary identification. *Proc. natl. Acad. Sci.U.S.A.* 55, 1574-1581

Vu Hai, M.T., F. Logeat, M. Warembourg, E. Milgrom (1977): Hormonal Control of Progesterone Receptors. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 286, 199-209

Wagner, R.K. (1972): Characterization and Assay of Steroid Hormone Receptors and Steroid-Binding Serum Proteins by Agarose Electrophoresis at Low Temperature. *Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem.* 353, 1325-1245

Walter, R. (1977): Identification of sites in oxytocin involved in uterine receptor recognition and activation. *Federation Proc.* 36, 1872-1878

Walters, M. R., J. H. Clark (1978): Cytosol and Nuclear Compartmentalization of Progesterone Receptors of the Rat Uterus. *Endocrinology* 103, 601-609

Warr, J. L., L. A. Branda (1983): The Role of Phospholipids in the Binding of Oxytocin to Its Receptors in Lactating Rabbit Mammary Gland. *Gynecol. obstet.Invest.* 15, 103-118

Watters, Ch. (1978): A One-Step Biuret Assay for Protein in the Presence of Detergent. *Anal. Biochem.* 88, 695-698

Zelinski, M. B., P. Noel, D.W. Weber, F. Stormshak (1982): Characterization of Cytoplasmic Progesterone Receptors in the Bovine Endometrium During Proestrus and Diestrus. *J. Anim. Sci.* 55, 376-383

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg und Herrn Prof. Dr. Dieter Schams möchte ich für die Aufgabenstellung sowie für die guten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Physiologie herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Heinrich Meyer für die vielen guten Ratschläge und anregenden Diskussionen.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern von Institut und Veitshof, im besonderen bei Frau Elisabeth Kürzinger für die stets freundliche Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

L e b e n s l a u f

30.03.1955	geboren in Landshut/Niederbayern
1961 - 1966	Besuch der Grundschule in Landshut
1966 - 1972	Besuch des Johannes-Nepomuk-Gymnasiums in Rohr/Niederbayern
1972 - 1975	Besuch des Hans-Carossa-Gymnasiums in Landshut, Abitur
Mai 75 - Dez. 76	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Landshut-Achdorf
Mai 78	Aufnahme des Studiums der Veterinär- medizin an der Freien Universität Berlin
Mai 84	Abschluß des Studiums, Staatsexamen
Juni 84	Approbation als Tierarzt
ab Nov. 84	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie der Südd. Ver- suchs- und Forschungsanstalt für Milch- wirtschaft in Freising/Weihenstephan (TU München), Anfertigung einer Dissertation

